

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leiter: Prof. Dr. H.P. Wolff)

FAKTOREN DER GALLENSTEINAUFLÖSUNG
IN VITRO

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Johannes Schäfer
aus Mühlheim/Main

Mainz 1977

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552619_0028

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leiter: Prof. Dr. H.P. Wolff)

FAKTOREN DER GALLENSTEINAUFLÖSUNG
IN VITRO

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen



vorgelegt von
Johannes Schäfer
aus Mühlheim/Main

Mainz 1977

Fachbereichsdekan: Prof. Dr. E. Straub

1. Gutachter: Prof. Dr. H.J. Weis

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Ewe



Inhaltsangabe

1.	<u>EINLEITUNG</u>	
1.1.	Vorkommen und Häufigkeit von Gallensteinen	2 - 3
1.2.	Pathophysiologie der Gallensteinbildung	3 - 10
1.2.1.	Lösungsbedingungen der Galle	3
1.2.1.1.	Gallensäuren	4
1.2.1.2.	Phospholipide	5
1.2.1.3.	Quantitative Verhältnisse zwischen Gallensäuren, Phospholipiden und Cholesterol	5 - 6
1.2.2.	Enterohepatischer Kreislauf	7 - 8
1.2.3.	Ursachen der Gallensteinentstehung	8
1.2.3.1.	Änderung der Gallenzusammensetzung	8
1.2.3.2.	Hepatogene Ursachen	9
1.2.3.3.	Ursachen von seiten der Gallenblase	9
1.2.3.4.	Hämolytische Erkrankungen	10
1.3.	Therapie des Gallensteinleidens mit Chenodesoxycholsäure	10 - 13
1.3.1.	Pathophysiologische Grundlagen	10
1.3.2.	CDC-Therapie beim Menschen	11
1.3.2.1.	Ergebnisse klinischer Studien	11
1.3.2.2.	Indikationen	12
1.3.2.3.	Kontraindikationen	12
1.3.2.4.	Nebenwirkungen	13

2.	<u>METHODEN</u>	
2.1.	Calciumbestimmung mit der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	14 - 21
2.1.1.	Prinzip der AAS	14 - 15
2.1.2.	AAS-Wasser	15
2.1.3.	Standardherstellung	15
2.1.3.1.	Meßmethode	16 - 17
2.1.3.2.	Standardkurven	18 - 21
2.2.	Calciumbestimmung in Gallensteinen	21 - 27
2.2.1.	Material	21 - 22
2.2.2.	Reagenzien	22
2.2.3.	Durchführung	23
2.2.3.1.	Aufbereitung der Proben	23
2.2.3.2.	Veraschung	23
2.2.3.3.	Messung	23 - 24
2.2.3.4.	Berechnung	24 - 25
2.2.4.	Ergebnis der Gallensteinanalysen	25 - 27
2.3.	Calciumbestimmung in Galle	27 - 28
2.4.	Vergleich der Calciumwerte: AAS-flammenphotometrische Methode	28 - 31
2.4.1.	Flammenphotometrische Calciumbestimmung	28 - 29
2.4.2.	Calciumbestimmung mit der AAS	30
2.4.3.	Ergebnisse	31
2.5.	Oberflächen- und Gewichtsbestimmung der Gallensteine	32
2.5.1.	Oberfläche	32
2.5.2.	Gewicht	32
2.6.	Cholesterolbestimmung in der Galle	33 - 34

3.	<u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	
3.1.	Auflösung von Gallensteinen in vitro	35 - 58
3.1.1.	Auflösung in künstlicher Galle	35
3.1.1.1.	Material	35 - 37
3.1.1.2.	Versuchsaufbau	38
3.1.1.3.	Zusammensetzung der künst- lichen Galle	39 - 40
3.1.1.4.	Durchführung	40
3.1.2.	Ergebnisse	41 - 58
3.1.2.1.	Gewichtsänderung der Gallen- steine	41 - 43
3.1.2.2.	Einfluß von Calciumgehalt, Oberfläche und Gewicht der Gallensteine auf die Lö- sungsgeschwindigkeit	44 - 51
3.1.2.3.	Calciumgehalt	51 - 52
3.1.2.4.	Oberfläche	52
3.1.2.5.	Gewicht	52 - 53
3.1.2.6.	Gemeinsamer Einfluß von Oberfläche und Gewicht	53 - 58
3.2.	Lösungsverhalten und Gallefluß	59 - 61
3.2.1.	Material und Durchführung	59
3.2.2.	Ergebnisse	59 - 61
3.3.	Änderungen der Gallenzusammen- setzung während der Steinauf- lösung	62 - 65
3.3.1.	Cholesterol	62 - 64
3.3.2.	Calcium	65
3.4.	Durchmesser der Gallensteine und Auflösungsgeschwindigkeit in vitro	66 - 70

4.	<u>DISKUSSION</u>	71 - 82
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	83 - 84
6.	<u>LITERATUR</u>	85 - 92

1. E I N L E I T U N G

Während bisher in der Therapie der Cholelithiasis die chirurgische Entfernung der Gallensteine die Therapie der Wahl darstellte, hat in den letzten Jahren die konservative Behandlung mit Chenodesoxycholsäure (CDC) an Bedeutung gewonnen.

Danzinger et al. (12) berichteten 1972 erstmals über Erfolge in der medikamentösen Auflösung von Cholesterolgallensteinen mit CDC. Andere Autoren (6,27) konnten die Wirksamkeit dieser Therapieform der Cholelithiasis bestätigen. Die Behandlungserfolge schwanken aber zur Zeit noch zwischen 0 - 68 % (59).

Um eine Steigerung der Erfolgsquote zu erzielen, ist es wichtig, mehr über das Verhalten von Cholesterolgallensteinen unter der CDC-Therapie zu erfahren.

In den letzten Jahren traten neben klinischen Studien immer mehr Untersuchungen in den Vordergrund, die die Aufklärung der biophysikalischen Vorgänge der Gallenauflösung in vitro zum Ziele hatten (5, 15,22,23,24,28,29,32,38,57).

Nach klinischen Studien von Iser et al. (27) waren in 11 Fällen mit calcifizierten, im Röntgenbild spontanschattengebenden Steinen, die über einen Zeitraum von 3 1/2 Jahren mit CDC behandelt worden waren, kein Erfolg der Therapie zu verzeichnen. Ebenso berichteten Bell et al. (6) von 9 Patienten und Bainton et al. (3) von 25 Patienten mit calcifizierten Gallensteinen, die auf die mehrmonatige Gabe von CDC nicht oder nur wenig ansprachen.

Auf Grund dieser Beobachtungen hat man die Schlußfolgerung gezogen, daß eine Behandlung mit CDC bei calcifizierten Gallensteinen zwecklos ist.

Nach Untersuchungen von Weis et al. (59) kann man aber nur dann im Röntgenbild mit einem Spontanschatten der Gallensteine rechnen, wenn der Calciumge-

halt dieser Steine 10 % übersteigt. Eine Hauptursache für das Versagen der medikamentösen Gallensteinauflösung ist somit darin zu vermuten, daß röntgenologisch negative Gallensteine bis zu 13 % Calcium enthalten können.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in der hier vorliegenden Arbeit in vitro untersucht, wie stark die Auflösungsgeschwindigkeit von Gallensteinen durch ihren Calciumgehalt beeinflußt wird. Dabei wurden sowohl röntgenologisch spontan- als auch nicht spontanschattengebende Steine verwendet.

Zur Bestimmung des Calciumgehaltes von Gallensteinen und Galle ist eine neue Methode erarbeitet worden, die in dieser Arbeit vorgestellt wird.

Ebenfalls untersuchten wir, inwieweit physikalische Größen wie Oberfläche der Gallensteine, ihr Gewicht und ihr Durchmesser die Auflösungsgeschwindigkeit beeinflussen.

In weiteren Experimenten ist der Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit der Galle auf die Auflösung dargestellt worden.

1.1. Vorkommen und Häufigkeit von Gallensteinen

Die Cholelithiasis und ihre Komplikationen stellt zur Zeit eines der wichtigen Gesundheitsprobleme in der Bevölkerung der BRD dar.

Bei ungefähr 5 Millionen Bürgern der BRD besteht eine Cholelithiasis (2). Bei den schätzungsweise 60 000 jährlich durchgeführten Cholecystektomien finden sich in über 80 % dieser Operationen Gallensteine (60).

Ingelfinger und Heaton (21,26) gaben für 1968 ca. 15 - 20 Millionen Erkrankungen an Gallensteinen in den USA an, wobei 10 % männliche und 20 % weibliche

Patienten, meist jenseits des 50. Lebensjahres, betroffen waren (17).

Einer der wichtigsten Gründe für die steigende Morbidität an Gallensteinen dürfte der zunehmende Lebensstandard, besonders in den westlichen Ländern, sein (21). So beträgt die Morbidität in Mitteleuropa ca. 12 %, in Finnland, Südafrika und Japan 8 - 12 %, in Afrika und Südamerika 0 - 8 % (2).

Neben Einflüssen der Ernährung, scheinen aber auch noch andere Faktoren auf die Gallensteinbildung zu haben: So findet man z.B. bei den amerikanischen Pima-Indianern ein Vorkommen von Gallensteinen bei 60 - 70 % der Frauen im Alter von 25 bis 45 Jahren, und bei den Männern eine viermal so hohe Erkrankungshäufigkeit wie bei weißen Männern (36,48). Andererseits werden bei den Massai-Negern keine Cholesterolgallensteine gefunden (7).

Diese Tatsachen lassen vermuten, daß auch genetische Faktoren eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Gallensteinen spielen (46).

1.2. Pathophysiologie der Gallensteinbildung

1.2.1. Lösungsbedingungen in der Galle

Der Hauptbestandteil der physiologischen Galle stellt mit 85 - 90 % das Wasser dar. Die verbleibenden 15 - 20 % setzen sich neben Bilirubin und Elektrolyten vorwiegend aus Gallensäuren, Phospholipid und Cholesterol zusammen.

Normalerweise wird das wasserunlösliche Cholesterol in der Galle durch die Bildung von Mizellen aus Gallensäuren und Phospholipid in Lösung gehalten. Folgende Faktoren spielen hierbei eine Rolle:

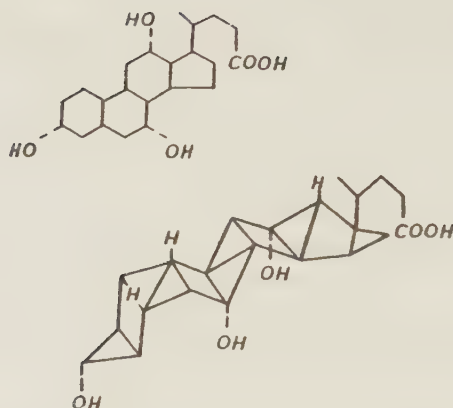


Abb. 1 Strukturformel und Modell der Cholsäure

1.2.1.1. Gallensäuren

Infolge ihrer chemischen Struktur, deren Grundlage das Sterolgerüst des Cholesterols bildet, besitzen die Gallensäuren ausgeprägte amphipatische Eigenschaften. Dies ist bedingt durch mehrere hydrophile Gruppen am Ringsystem, sowie eine ebenfalls hydrophile Seitenkette im Gegensatz zum hydrophoben Kern des Sterolgerüsts.

Beim Überschreiten der sogenannten "kritischen Mizellaren Konzentration" der Gallensäuren, lagern sich diese zu Molekülaggregaten (Mizellen) zusammen (38). Die hydrophilen Gruppen sind dabei zum umgebenden wäßrigen Milieu gerichtet, während die hydrophoben Molekülanteile im Inneren der Mizelle eine lipophile Phase bilden (8). Man kann primäre Mizellen mit bis zu acht und sekundäre Mizellen mit mehr als zehn Gallensäuremolekülen unterscheiden (10).

In diesen nur aus Gallensäuren gebildeten Mizellen können aber nur geringe Mengen Cholesterol (ca. 3 %

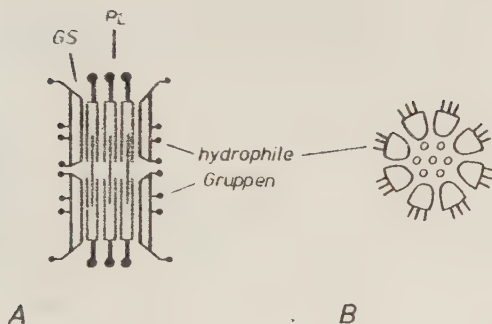


Abb. 2 Schema einer gemischten Mizelle
(nach Carey u. Small, (13))
A Längsschnitt B Querschnitt

des Mizellengewichtes) (13) gelöst werden.

1.2.1.2. Phospholipide

Das wesentliche Phospholipid der Galle stellt mit 96 % das Lezithin dar. Das Lezithinmolekül lagert sich zwischen die Gallensäuremoleküle und bildet so gemischte Mizellen. Maximal können auf diese Weise 1 Cholesterollmolekül durch 1 Molekül Lezithin in Lösung gebracht werden (38).

Da die gemischten Mizellen größer als einfache Mizellen sind, können sie so bis zu 10 % ihres Gewichtes an Cholesterol lösen (13).

1.2.1.3. Quantitative Verhältnisse zwischen Gallensäuren, Phospholipid und Cholesterol

Admirand und Small (1) erkannten durch in-vitro-Versuche, daß nicht die absoluten Konzentrationen von Gallensäuren und Cholesterol in der menschlichen Galle für die Löslichkeit des Cholesterols von Bedeutung sind. Die Cholesterollöslichkeit wird vielmehr von dem molaren Verhältnis der Gallensäuren, der Phospho-

lipide und des Cholesterols zueinander bestimmt.

Durch Darstellung in einem dreieckigen Koordinatensystem, läßt sich jede denkbare Relation dieser

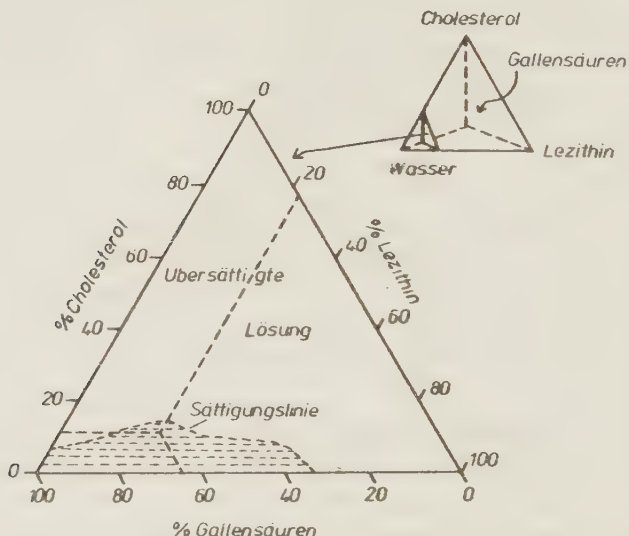


Abb. 3 Koordinatensystem nach Admirand u. Small (1)

drei Komponenten durch einen Punkt definieren. Dadurch wird die Abgrenzung jenes physikalisch-chemischen Bereiches möglich, in dem sich Cholesterol in einer echten mizellaren Lösung befindet. Außerhalb dieses durch die Sättigungslinie abgegrenzten Bereiches ist die Galle mit Cholesterol übersättigt. Hier besteht dann ein als Lösung instabiles Zwei- oder Dreiphasensystem.

Die günstigsten Lösungsbedingungen sind bei einem Verhältnis Gallensäuren : Phospholipid : Cholesterol wie 60 : 30 : 10 bis 70 : 20 : 10 vorhanden (13).

1.2.2. Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren

Der Gallensäurepool des Menschen, d.h. die Gesamtmenge der im Organismus vorhandenen Gallensäuren, beträgt ca. 2 - 3 g (17). Er zirkuliert täglich mehrfach in folgender Weise:

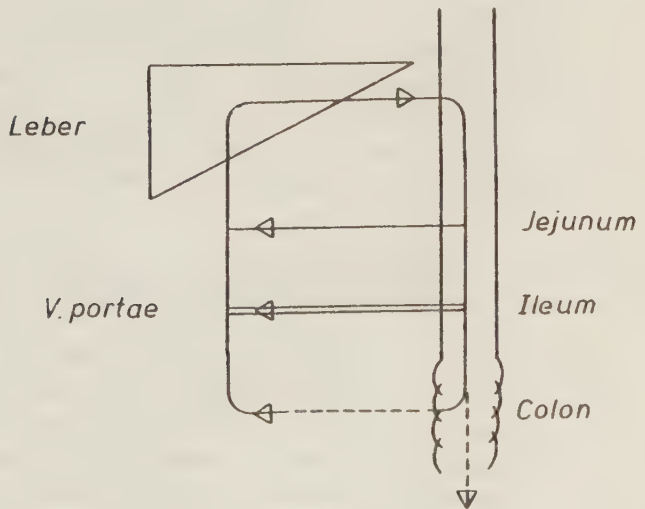


Abb. 4 Enterohepatischer Kreislauf
der Gallensäuren

Mit der Galle werden die Gallensäuren in den Darm sezerniert und hauptsächlich im Ileum wieder rückresorbiert. Über das Pfortaderblut gelangen die Gallensäuren wieder zurück zur Leber, wo sie erneut in die Gallenwege ausgeschieden werden.

Ein Teil der primären Gallensäuren (Cholsäure, Chenodesoxycholsäure) wird durch die Darmflora zu den

sekundären Gallensäuren (Desoxycholsäure, Lithocholsäure) abgebaut, die teils wieder resorbiert, teils in dieser Form mit dem Stuhl ausgeschieden werden (14).

Führt man dem Organismus oral Gallensäuren zu, wie dies bei der Therapie mit Chenodesoxycholsäure geschieht, so wird auch diese im Ileum weitgehend resorbiert und durchläuft dann den enterohepatischen Kreislauf. Der Gallensäurepool wird so vergrößert.

Neben den Gallensäuren durchlaufen auch die Phospholipide und das Cholesterol einen enterohepatischen Kreislauf: Triglyzeride und Cholesterol treten von den Mukosazellen des Jejunums in die Lymphgefäße des Darmes über. Sie werden dann in Form von Chylomikronen über den Ductus thoracicus dem großen Kreislauf zugeführt und von der Leber wieder in die Gallenwege sezerniert.

1.2.3. Ursachen der Gallensteinentstehung

1.2.3.1. Änderung der Gallenzusammensetzung

Durch eine Verkleinerung des Gallensäurepools infolge Synthesestörung der Leber oder verminderter Rückresorption der Gallensäuren im Ileum, wird das Verhältnis von Gallensäuren, Phospholipid und Cholesterol dahingehend verändert, daß weniger Cholesterol in Lösung gehalten werden kann (54,55,56). Da die Phospholipidsekretion durch die Gallensäuren stimuliert wird, nimmt bei einer Verkleinerung des Gallensäurepools auch die Phospholipidkonzentration in der Galle ab (18).

Die Lösungskapazität der Galle für Cholesterol wird auf diese Weise herabgesetzt.

Tatsächlich fanden Heaton und Read (20) bei Patienten mit Gallensäureverlustsyndrom durch Erkrankung des Ileums vermehrt Gallensteine.

1.2.3.2. Hepatogene Ursachen

Small (38) nimmt an, daß die Gallensäuren beim Durchschleusen durch die Leberzelle Lecithin und Cholesterol aus der Zellmembran der Hepatozyten herauslösen. Ist der Stoffwechsel des Hepatozyten gestört, so ist es möglich, daß die Zellmembran zuviel Cholesterol oder zuwenig Lecithin enthält und so durch die Gallensäuren mehr Cholesterol bzw. weniger Lecithin aus der Membran herausgelöst werden kann. Es entstehen so instabile Mizellen, die Cholesterol nicht mehr in Lösung halten können.

1.2.3.3. Ursachen von seiten der Gallenblase

Da die Steinbildung fast ausschließlich in der Gallenblase erfolgt, scheint diesem Organ eine besondere Bedeutung zuzukommen.

Neben der Anlagerung des Cholesterols an Kristallisationskernen (Leukozyten oder desquamierte Zellen) (38), können durch bakterielle Infektionen der Galle Gallensäuren dekonjugiert werden, was zu einer verschlechterten Mizellenbildung führt (37).

Welchen Einfluß eine Stase der Galle infolge verminderter Gallenblasenmotilität auf die Steinentstehung hat, ist bisher noch nicht nachgeprüft worden. Würbach und Weis (63) konnten aber nachweisen, daß Gallensteinträger eine schlechtere Entleerung der Gallenblase nach Gabe einer gleich großen Dosis Cholezystokinin zeigen als Normalpersonen.

Ferner wird diskutiert, ob die vermehrte Steinbildung nach einer Schwangerschaft durch eine Verlagerung der Gallenblase infolge des höher stehenden Uterus mit nachfolgender Entleerungsstörung der Gallenblase begünstigt wird (61).

1.2.3.4. Hämolytische Erkrankungen

Bei Hämolyse treten in 25 - 50 % der Fälle Gallensteine auf (9), da die Gallenblase nicht fähig ist, das durch den Hämoglobinabbau vermehrt anfallende freie Bilirubin zu resorbieren. Das schlecht wasserlösliche freie Bilirubin fällt aus und es bilden sich Calcium-Bilirubin-Steine.

Neben diesem Mechanismus der Calcium-Bilirubin-Steinbildung wird die Entstehung dieser Konkreme durch bakterielle Infektion der Galle mit *E. coli* diskutiert (30), wobei wasserlösliches Bilirubinid-glukuronid durch die unter normalen Bedingungen nicht vorhandene β -Glukuronidase in wasserunlösliches Bilirubin umgewandelt wird.

1.3. Therapie der Cholelithiasis mit Chenodesoxycholsäure

1.3.1. Pathophysiologische Grundlagen

Bisher ist die Therapie der Cholelithiasis die Domäne der Chirurgen gewesen. Aus den oben geschilderten pathophysiologischen Zusammenhängen der Entstehung von Cholesterolgallensteinen ergeben sich aber neue therapeutische Aspekte, die vor allem auf der Bedeutung der Gallensäuren im Rahmen der Gallenzusammensetzung gründen.

Bei der internistischen Behandlung von Cholesterolgallensteinen wird versucht, durch Erhöhung des Gallensäureanteils in der Galle, die mizellare Löslichkeit des Cholesterols zu erhöhen. Da gleichzeitig mit der Erhöhung der Gallensäurekonzentration auch eine verstärkte Phospholipidsekretion einsetzt (18), wird hierdurch zusätzlich die mizellare Lösungskapazität für Cholesterol verbessert. Es besteht so die Möglichkeit, daß durch den Anstieg der mizellaren Lösungskapa-

zität auch bereits kristallisiertes Cholesterol in Lösung gehen kann.

Neuere Untersuchungen weisen neben der Erhöhung des Gallensäurepools auch auf eine Hemmung der Cholesterolsynthese in der Leber (31) und auf eine Verminderung der Cholesterolsekretion in die Galle (34, 49) hin.

So verursachen sowohl der Einsriff in den Leberzellstoffwechsel, als auch die Erhöhung des Gallensäurepools günstige Bedingungen, um Cholesterolgalensteine aufzulösen.

1.3.2. CDC-Therapie beim Menschen

In den im folgenden angeführten Untersuchungsreihen wurde Chenodesoxycholsäure (CDC) in Dosen zwischen 0,75 und 1,5 g/die gegeben. Insgesamt zeigte sich in 50 - 60 % der angegebenen Fälle nach 6 bis 12 Monaten ein Ansprechen auf die Therapie.

1.3.2.1. Ergebnisse klinischer Studien

Thistle und Schoenfield (51,52) berichteten 1971 erstmals, daß die Gabe von CDC in einer Dosierung von 0,75 bis 1,0 g/die die Lithogenität der Galle von jungen Indianerinnen verringerte. Cholsäure zeigte keine Wirkung.

Danzinger et al. (12) behandelten 7 Patienten mit symptomlosen, röntgenologisch nicht spontanschattengebenden Steinen über einen Zeitraum von 6 bis 24 Monaten. Bei einer Patientin verschwanden nach sechsmonatiger Einnahme von CDC 3 Steine vollständig, bei 3 Patientinnen wurde nach 24 Monaten je 1 Stein aufgelöst.

Bell et al. (6) berichteten von 4 Patienten, bei denen nach sechsmonatiger Therapie ein völliges Ver-

schwinden der Steine erreicht wurde, während sich bei weiteren 4 Patienten die Steine im gleichen Zeitraum verkleinerten. Keine Veränderungen traten bei 9 Patienten mit großen und spontanschattengebenden Steinen auf.

Nach einer Studie von Iser et al. (27), zeigten 64 % der Patienten mit nicht spontanschattengebenden Steinen eine teilweise oder vollständige Auflösung.

1.3.2.2. Indikationen

Um eine möglichst hohe Erfolgsquote bei der CDC-Therapie zu erzielen, müssen nach bisherigen klinischen Erfahrungen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

- 1.) röntgenologisch strahlendurchlässige Konkreme der Gallenblase oder des Ductus choledochus und normale Leberfunktion.
- 2.) hauptsächlich kleine Konkreme unter 20 mm Durchmesser im Röntgenbild (27).
- 3.) Patienten mit hohem Operationsrisiko.

1.3.2.3. Kontraindikationen (58)

- 1.) Negatives intravenöses Cholezystogramm
- 2.) Malabsorptionssyndrom
- 3.) Ulcus pepticum
- 4.) Nulldiät
- 5.) Schwere Systemerkrankungen (Leukämie, Niereninsuffizienz)
- 6.) Drogen- und Alkoholabusus
- 7.) Geisteskrankheiten
- 8.) Leber- und Gallenwegserkrankungen (Ausnahme: leichte Fettleber oder Stauungsleber)
- 9.) spontanschattengebende Steine

1.3.2.4. Nebenwirkungen

Bei Gabe von 0,75 g CDC und mehr besteht die Möglichkeit einer Diarrhö infolge der laxierenden Wirkung von Gallensäuren (14).

Ebenfalls wurde ein Anstieg der Serumtransaminasen beobachtet, doch konnten keine pathologischen Veränderungen der Leber bisher nachgewiesen werden (49). Eine Senkung der Serumtriglyzeride konnte Begeman (4) nachweisen.

Andere Nebenwirkungen der CDC-Therapie auf den Magendarmtrakt und das hämopoetische System konnten bisher nicht beobachtet werden.

Nach Absetzen der CDC-Therapie ist es durchaus möglich, daß wieder die ursprüngliche, "pathologische" Galle gebildet wird, was zum erneuten Auftreten von Konkrementen führen kann (14).

2. M E T H O D E N

2.1. Calciumbestimmung mit der Atomabsorptions- spektrometrie (AAS)

Sutor et al. (43,44,45) haben als erste daraufhingewiesen, daß sich die Gallensteinforschung nicht nur mit dem Cholesterol, sondern auch mit dem Calcium befassen sollte (62).

Nach Studien von Weis et al. (59), ist wahrscheinlich eine der Hauptursachen für das Versagen der medikamentösen Gallensteinauflösung mit CDC darin zu sehen, daß röntgenologisch nicht spontanschattengebende Gallensteine bis zu 13 % Calcium enthalten können.

Bisher wurde Calcium in Gallensteinen nach den Angaben von Nakayama (33) bestimmt.

In dieser Arbeit wird nun mit der Calciumbestimmung durch die Atomabsorptionsspektrometrie ein Verfahren vorgestellt, das sich im Vergleich mit der bisherigen Methode als einfacher in seiner Handhabung und genauer in der Erfassung des zu bestimmenden Calciums erweist.

2.1.1. Prinzip der AAS

Von einer Hohlkathodenlampe, deren Kathode das zu bestimmende Element enthält, wird über einen Monochromator Licht äußerst geringer Bandbreite durch eine Flamme aus Azethylen-Luft-Gemisch geschickt. Über einen Vernebler wird die Flüssigkeit mit dem zu bestimmenden Element (z.B. Calcium) in diese Flamme eingesprüht.

Die durch Wärmezufuhr aktivierten Atome absorbieren abhängig von ihrer Konzentration einen Teil des

einfallenden Lichtes. Der Intensitätsabfall des ausstrahlenden Lichtes wird photometrisch gemessen (16,53).

Zur Messung werden die Proben zuvor mit 0,5 %iger Lanthan-Lösung vermischt, damit Phosphor keine Komplexverbindungen mit Calcium eingeht, und so Calcium der Bestimmung entzogen wird.

Wegen der großen Empfindlichkeit dieser Methode, dürfen nur Pipetten aus calciumfreiem Glas verwendet werden.

2.1.2. AAS-Wasser

In einer Plastikflasche von 5 - 10 l Volumen wird bidestilliertes Wasser gegeben (AAS-Wasser).

Nur Wasser aus dieser Flasche darf zur Herstellung der Verdünnungen von Standard und Proben, sowie für die Herstellung der 1 N-HCl (s.u.) verwendet werden. Es wird somit sichergestellt, daß alle Proben den gleichen Leerwert haben.

Die Plastikflasche soll das Datum der letzten Füllung tragen und nach 2 - 3 Wochen erneuert werden.

2.1.3. Standardherstellung

Ausgehend von einer Originalstandardelektrolytlösung (5 mval/l Ca) wurden in Meßkolben die in Tabelle 1 angegebenen Standardverdünnungen mit AAS-Wasser hergestellt.

Nach 20-maligem Umschütteln wurden diese Standardverdünnungen in gut verschließbare Plastikbehälter überführt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.3.1. Meßmethode

Zur Bestimmung der Calciumkonzentration und der ihr zugehörigen Atomabsorption wurden mit Eppendorf-Pipetten 1 ml Standardverdünnung in feste Plastikröhrchen pipettiert.

Nach Zugabe von 5 ml 0,5 %iger Lanthan-Lösung wurden die Proben gut gemischt und innerhalb sechs Stunden im Atomabsorptionsspektrometer gemessen. Von jeder Standardverdünnung wurden Doppelbestimmungen zur Messung eingesetzt.

Das von uns benutzte Atomabsorptionsspektrometer (Perkin Elmer 403) ist bei der routinemäßigen Calciumbestimmung im Serum auf eine 1:51 Verdünnung der Proben geeicht (0,1 ml Serum + 5 ml Lanthan-Lsg.). Infolge der geringen Calciumkonzentration, die wir in den Standards bestimmen wollten, mußten wir bei der oben beschriebenen Eichung des Gerätes eine zehnfach höhere Probenmenge zur Verdünnung einsetzen (1 ml Probe + 5 ml Lanthan-Lsg.), damit das Calcium vom Gerät noch erfaßt wurde.

Damit wird verständlich, weshalb die vom Gerät angezeigten Calciumkonzentrationen rund das Zehnfache der zur Bestimmung eingesetzten Calciumkonzentrationen betragen (vergl. Tab. 2, Spalte 2 und 3).

Tabelle 1: Verdünnungen der Originalstandard-
elektrolytlösung (5 mval/l Ca)

Lfd. Nr.	Calcium (mval/l)	Original-Std. (ml)	AAS-Wasser (ml)	Std.- Verdünnung
1	3,00	12	20	6,0:10
2	2,75	11	20	5,5:10
3	2,50	10	20	5,0:10
4	2,25	9	20	4,5:10
5	2,00	8	20	4,0:10
6	1,75	7	20	3,5:10
7	1,50	6	20	3,0:10
8	1,25	5	20	2,5:10
9	1,00	20	100	2,0:10
10	0,75	15	100	1,5:10
11	0,50	10	100	1,0:10
12	0,25	5	100	1,0:20
13	0,10	2	100	1,0:50

2.1.3.2. Standardkurven

Es wurden die in Tabelle 2 und den Diagrammen 1 und 2 dargestellten Werte für die eingesetzten Calciumkonzentrationen im AAS gemessen:

Tabelle 2:

Lfd. Nr.	Std.-Ca (mval/l)	Ca im AAS (mval/l)	Absorption im AAS
1	3,00	29,41 31,23	0,504 0,516
2	2,75	27,18 27,13	0,449 0,451
3	2,50	25,22 25,10	0,419 0,419
4	2,25	22,65 23,71	0,372 0,381
5	2,00	20,29 19,97	0,331 0,335
6	1,75	17,18 17,63	0,299 0,302
7	1,50	15,12 14,92	0,251 0,249
8	1,25	12,49 12,19	0,217 0,207
9	1,00	10,14 9,99	0,177 0,174
10	0,75	7,50 7,59	0,128 0,131
11	0,50	5,04 5,41	0,087 0,090
12	0,25	3,07 3,09	0,042 0,043
13	0,10	1,32 1,35	0,018 0,018
14	0,00	0,11 0,10	0,001 0,000

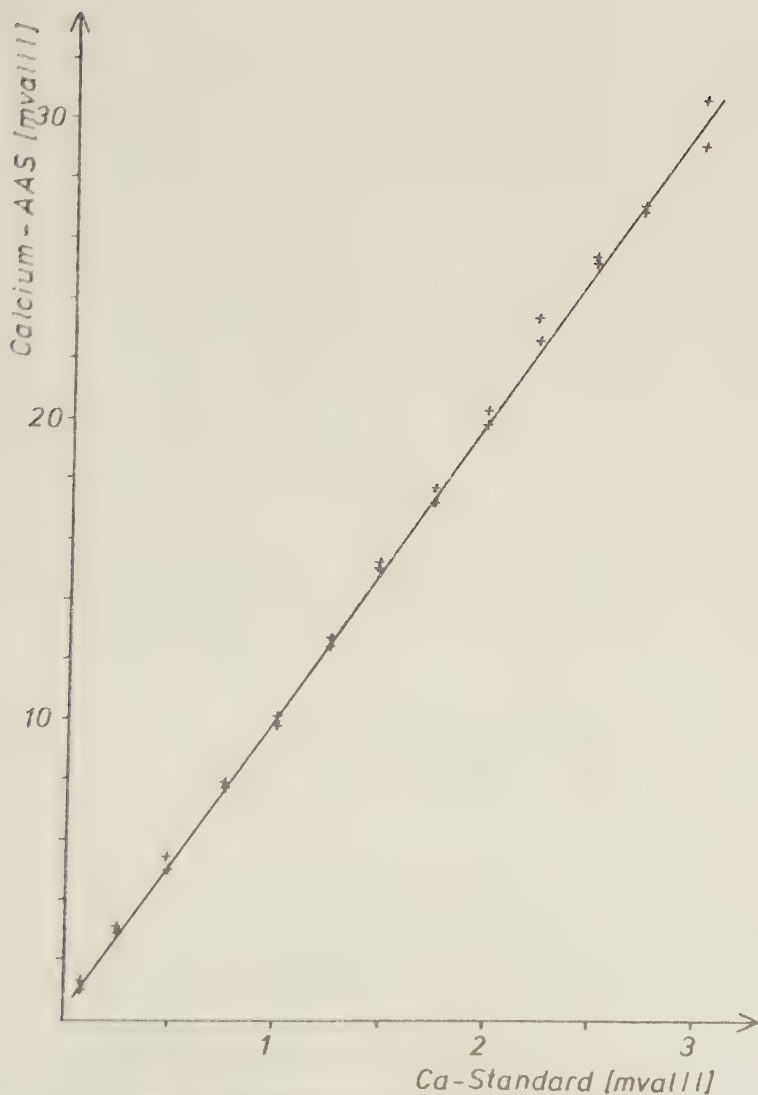


Diagramm 1: Eichkurve der Calciumbestimmung, mit dem Atomabsorptionsspektrometer (AAS).

Ca-Standard: Verdünnungen einer bekannten Standard-elektrolytlösung.

Calcium-AAS: vom AAS angezeigte Calciumkonzentration der Standardverdünnungen.

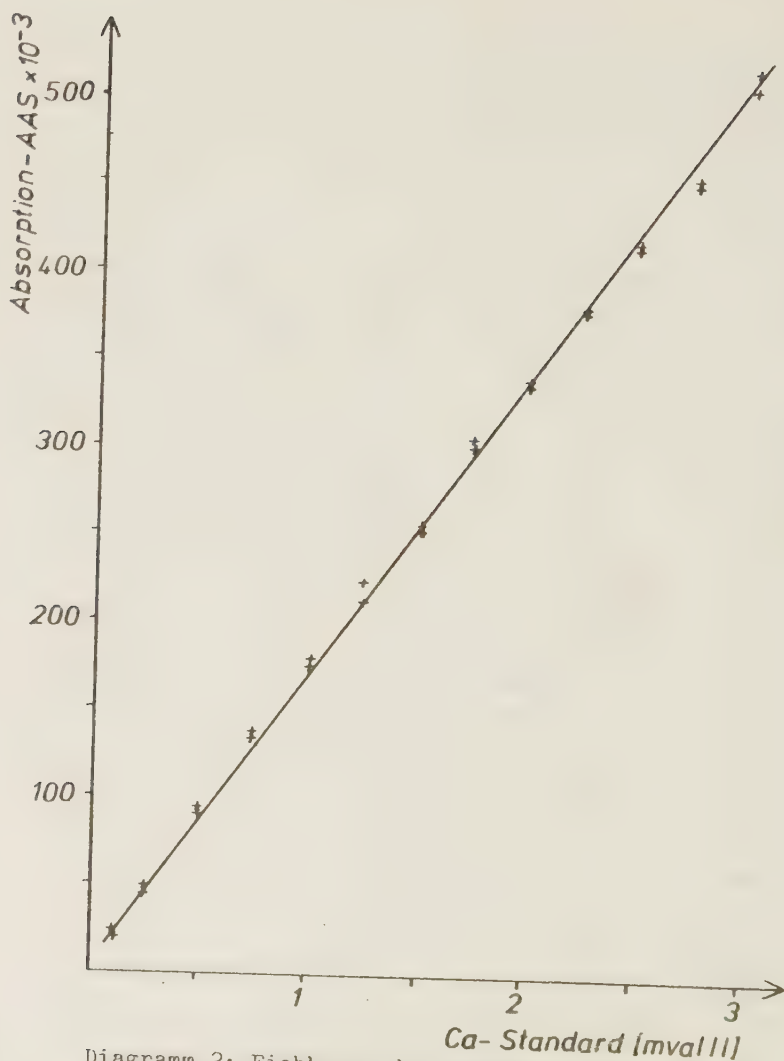


Diagramm 2: Eichkurve der Calciumbestimmung mit dem Atomabsorptionsspektrometer (AAS).

Ca-Standard: Verdünnungen einer bekannten Standard-elektrolytlösung.

Absorption-AAS: vom AAS angezeigte Werte der Energieabsorption des Calciums.

Aus Diagramm 1 und 2 ergibt sich, daß bei unseren Standardverdünnungen bis zu einer Calciumkonzentration von 3,0 mval/l in der Probe (was einer Absorption von 0,500 im AAS entspricht; s. Diagramm 2) die Konzentrationsanzeige im AAS streng proportional der tatsächlich vorhandenen Calciumkonzentration ist.

Enthält eine Probe mehr als 3,0 mval/l Calcium, d.h. ist der vom Gerät angezeigte Wert größer als 30,0 mval/l (bzw. eine Absorption größer als 0,500), so wird die Probe weiter verdünnt und die Bestimmung im AAS wiederholt.

Bei unseren Untersuchungen wurde der Meßbereich nicht über 30,0 mval/l Geräteanzeige ausgedehnt. Werte über 30,0 mval/l reichen nahe an die Anzeigegrenze des Gerätes von 40,0 mval/l heran. Die untere Bestimmungsgrenze lag bei 0,1 mval/l Geräteanzeige.

2.2. Calciumbestimmung in Gallensteinen

2.2.1. Material

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Zusammenhänge zwischen dem Calciumgehalt von Cholesteroll Gallensteinen und deren Auflösungsgeschwindigkeit in einer der physiologischen Zusammensetzung nahekommenden Galle zu untersuchen.

Bei 14 Patienten, deren präoperative Cholezystogramme vorlagen, wurden die Gallensteine in der chirurgischen Universitätsklinik Mainz entfernt und anschließend auf ihren Calciumgehalt hin analysiert.

Nach Angaben von Roes und Weis (35), besitzen gal-

lensteine, die aus derselben Gallenblase entnommen wurden und gleiches makroskopisches Aussehen haben, die gleiche chemische Zusammensetzung. Somit konnten wir einen Teil der operativ entfernten Gallensteine der chemischen Analyse zuführen, während ein anderer Teil für die in Abschnitt 3. beschriebenen in-vitro-Studien verwendet werden konnte.

Es handelte sich hauptsächlich um Cholesterolgallensteine, deren Oberfläche größtenteils facettiert war.

Steine von 4 Patienten wiesen nach Zerschneiden mit einem Skalpell makroskopisch eine Schichtung auf (Kern und Schale), so daß hier der Calciumgehalt in den einzelnen Schichten getrennt bestimmt wurde. (vergl. Tab. 3)

2.2.2. Reagenzien

HCl - konz. p.a.	Fa. Merck
HNO ₃ - konz. p.a.	Fa. Merck
1 N-HCl (bereitet mit AAS-Wasser)	
Perhydrol (30%) p.a.	Fa. Merck
AAS-Wasser	
5 %ige Lanthan-Lösung	

2.2.3. Durchführung

2.2.3.1. Aufbereitung der Proben

- 1.) Die Gallensteine wurden in einem 50 ml-Glasbecher bei 50 - 70°C getrocknet. Zwei Gewichtskontrollen im Abstand von 6 Stunden mußten konstante Ergebnisse zeigen.
- 2.) Ein Gallenstein wurde in einem Mörser zermörsert und das Pulver gemischt.
- 3.) Von der Mischung wurden 2 x 10 mg Steinpulver abgewogen und in einen 50 ml Veraschungskolben aus calciumfreiem Glas gegeben.
- 4.) Zugabe von: 0,3 ml HNO₃-konz. p.a.
0,9 ml HCl -konz. p.a.
zu jeder Probe und in einen leeren Kolben (Leerwert).

2.2.3.2. Veraschung

- 1.) Vor dem Aufsetzen auf die Heizplatte (Temperatur ca. 400°C) wurden zu jeder Probe und dem Leerwert 10 Tropfen Perhydrol zugegeben.
- 2.) Wenn fast alle Säure verdampft ist, läßt man die Kolben etwas abkühlen und gibt erneut 10 - 15 Tropfen Perhydrol zu. Das Gemisch wurde wieder erhitzt, bis der Kolbeninhalt weiß war. Es durften keine schwarzen Rückstände mehr vorhanden sein.

2.2.3.3. Messung

- 1.) Waren die Kolben auf Zimmertemperatur abgekühlt, wurden 2 ml 1 N-HCl hinzugegeben. Nach mehrmaligem Schwenken wurden 20 ml AAS-Wasser hinzugegeben. Die Kolben wurden

verschlossen und für 10 Minuten in ein 60°C warmes Wasserbad gestellt.

- 2.) Der Kolbeninhalt wurde erneut gemischt und davon mit einer Eppendorf-Plastikpipette 1 ml in feste Plastikröhrchen pipettiert.
- 3.) Vor der Bestimmung im Atomabsorptionsspektrometer wurden 5 ml 5 %ige Lanthan-Lösung zugegeben und der Röhrcheninhalt gut gemischt. Die Messung sollte jetzt innerhalb der nächsten 6 Stunden erfolgen.
- 4.) Mit jeder Probengruppe (20 Proben) wurden zwei Standards (1 mval/l und 0,25 mval/l Ca) mitbestimmt.
Die Messung erfolgte gegen einen Leerwert aus 1 ml AAS-Wasser und 5 ml Lanthan-Lösung.
- 5.) Die Linearität der AAS wurde nachgewiesen in einem Bereich zwischen 1 mval/l und 30,0 mval/l Geräteanzeige (s. Diagramm 1). Wurden außerhalb dieses Bereiches Werte angezeigt, so sind die Proben verdünnt und erneut bestimmt worden.

2.2.3.4. Berechnung

Da das AAS bei der Calciumbestimmung auf eine 1 : 51 Verdünnung der Proben geeicht ist, bei unserer Bestimmung der Kolbeninhalt aber 1 : 6 verdünnt wurde (1 ml Koldeninhalt + 5 ml Lanthan-Lösung), müssen die vom Gerät angezeigten Konzentrationen entsprechen umgerechnet werden.

Es ergibt sich folgende Gleichung:

$$\text{Calcium (mg/100 mg Stein)} = 2 \frac{S (G_P - G_L) F}{G_S M}$$

wobei: S = Calciumkonzentration im Standard (mval/l)
 G_S = AAS-Anzeige des Standards (mval/l)
 G_P = AAS-Anzeige der Probe
 G_L = AAS-Anzeige des Leerwertes (mval/l)
 F = Flüssigkeitsmenge im Veraschungskolben (ml)
 M = Eingewogene Steinmenge (mg)

Meßbereichsgrenze: Die strenge Proportionalität zwischen spektrometrisch angezeigter und tatsächlich vorhandener Calciumkonzentration konnte bis zu einer unteren Geräteanzeige von 1,33 mval/l nachgewiesen werden (s. Diagramm 1 und 2). Dies entspricht einer tatsächlichen Calciumkonzentration von 0,1 mval/l in 1ml Probe.

Legen wir zur Berechnung der unteren Bestimmungsgrenze für Calcium mit der obigen Gleichung diese Werte ($G_P = 1,33$ mval/l, $S = 0,1$ mval/l) zugrunde, so ergibt sich bei einer Einwaage $M = 10$ mg Steinpulver und einer Flüssigkeitsmenge $F = 22$ ml im Veraschungskolben eine minimal bestimmbare Calciummenge von 0,44 mg in 100 mg Stein, die durch die beschriebene Methode noch sicher erfaßt werden kann. D.h., daß bei dieser Versuchsanordnung bis 0,5 % Calcium genau bestimmt werden konnte.

2.2.4. Ergebnisse der Gallensteinanalysen

Die Analysen zeigten:

- 1.) In 3 Fällen, in denen makroskopisch zwischen einem Kern und einer Schale des Steines unter-

Tabelle 3: Calciumbestimmung in Gallensteinen
von 14 Patienten mit der Atomabsor-
ptionsspektrometrie

Lfd. Nr.	Form	Röntgen- bild	Ca (mg/100 mg)
1	facettiert	-	7,6
2	"	-	1,6
3	"	-	0,5
4	"	-	0,0
5a	"	-	0,0
b	"	-	0,0
6	"	-	0,0
7	"	-	0,0
8a	"	-	0,0
b	"	-	0,0
9a	"	-	0,0
b	"	-	0,0
10	"	-	1,7
11	"	-	8,5
12a	"	-	1,3
b	"	+	13,6
13	stachelig	+	16,9
14	unregel- mäßig	+	28,5

Röntgenbild: + strahlendicht

- strahlendurchlässig

a Kern

b Schale

schieden werden konnte, lagen keine Unterschiede im Calciumgehalt der Schichten vor. (Tab. 3, Nr. 5,8,9)

- 2.) Bei 6 Patienten mit röntgenologisch nicht spontanschattengebenden Steinen wurde kein Calcium nachgewiesen. (Tab. 3, Nr. 4-9)
- 3.) Obwohl 5 Patienten röntgenologisch nicht spontanschattengebende Steine zeigten, konnte in diesen Steinen Calcium in einer Konzentration bis zu 8,5 mg/100mg nachgewiesen werden. (Tab. 3, Nr. 1,2,3,10,11,12a)
- 4.) In 3 Fällen enthielten strahlendichte Steine über 13,6 mg/100mg Calcium. (Tab. 3, Nr. 12b, 13,14)

Zusammenfassend kann man sagen, daß nach unseren Analysen Steine mit makroskopisch unterschiedlichen Schichten nicht auch unterschiedliche Calciumkonzentrationen in den einzelnen Schichten besitzen müssen. Ebenso wird deutlich, daß auch nicht spontanschattengebende Steine nach unseren Ergebnissen bis zu 8,5 mg% Calcium enthalten können.

Die entspricht den Ergebnissen von Weis und Roes (59), wonach Calcium in einer Konzentration von mehr als 10 % in Gallensteinen vorliegen muß, um einen Spontanschatten im Röntgenbild zu zeigen.

2.3. Calciumbestimmung in Galle

In einen 50 ml-Veraschungskolben wurde 1 ml Galle pipettiert. Der Kolbeninhalt wurde nun so lange erhitzt, bis fast alle Flüssigkeit verdampft war. Nach Zugabe von 0,3 ml HNO_3 -konz. und 0,9 ml HCl -konz. wurde mit Perhydrol verascht, bis keine schwarzen

Rückstände mehr vorhanden waren.

Der weitere Bestimmungsgang entspricht dem in Abschnitt 2.2.3.3. beschriebenen Schritten der Calciumbestimmung mit der AAS.

2.4. Vergleich der Calciumwerte: AAS - flammenphotometrische Methode

In den letzten Jahren befaßten sich mehrere Studien mit der Analyse kalkhaltiger Konkremeute.

Insbesondere haben Sutor et al. (40,41,42) Röntgenbeugungsanalysen zur Bestimmung der chemischen Verbindungen, in denen Calcium in Gallensteinen vorliegt, unternommen.

Calcium lag dabei hauptsächlich als Karbonat (CaCO_3) in den Modifikationen Kalzit, Aragonit und Vaterit vor. Daneben geht Calcium aber auch Phosphatverbindungen als Apatit ($\text{Ca}_5((\text{PO}_4)_3\text{Cl})$) oder White-lockite ein (62).

Wir untersuchten, wie genau die flammenphotometrische Calciumbestimmung nach Nakayama (33) und die von uns entwickelte Methode eine vorgegebene Menge Calcium in den Verbindungen Calciumkarbonat (CaCO_3), Tri-Calciumphosphat ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)(\text{OH})$) und Calciumsulfat (CaSO_4) erfaßten.

2.4.1. Flammenphotometrische Calciumbestimmung

In Veraschungskolben aus calciumfreiem Glas wurden folgende Calciumverbindungen eingewogen (jeweils Dreifachbestimmungen).

			Ca-gehalt
CaCO_3	p.a.	MG. 100,07	40mg/100mg
$\text{Ca}_5(\text{PO})_4(\text{OH})$	p.a.	MG. 502,32	39,8 mg/100mg
$\text{CaSO}_4(2\text{H}_2\text{O})$	p.a.	MG. 172,17	23,4 mg/100mg

Nach Zugabe von 1 ml 10 N-Schwefelsäure wurde mit Perhydrol verascht. Der klare Veraschungsrückstand wurde nach Überführung in ein 50 ml-Becherglas mit Ammoniaklösung neutralisiert und anschließend die Calciumkonzentration in 50 ml Flüssigkeit flammenphotometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Flammenphotometrische Calciumbestimmung

Ca-salz	Einwaage (mg)	Ca-konz. erwartet (mg/100mg)	Ca-konz. Fl.-phot. (mg/100mg)	Erfaßtes Ca (%)
CaCO_3	10,046		33,8	84,5
"	10,322		34,4	86,0
"	10,249		34,4	86,0
		40,0	$\bar{x}$ 34,2	$\bar{x}$ 86,5
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	10,001		28,5	71,6
"	10,125		31,3	78,6
"	9,981		31,8	79,8
		39,8	$\bar{x}$ 30,6	$\bar{x}$ 76,6
$\text{CaSO}_4(2\text{H}_2\text{O})$	10,250		20,3	86,7
"	10,110		20,3	86,7
"	10,154		19,9	85,3
		23,4	$\bar{x}$ 20,2	$\bar{x}$ 86,4

Mit der flammenphotometrischen Bestimmungsmethode nach Veraschung mit Schwefelsäure wurden nur rund 85 % des Calciums in Calciumkarbonat und -sulfat bzw. nur 76 % des Calciums in Calciumphosphat erfaßt.

2.4.2. Calciumbestimmung mit der AAS

Die gleichen Calciumverbindungen wie unter 2.4.1. wurden in calciumfreie Veraschungskolben eingewogen (jeweils Dreifachbestimmung). Danach wurde der in Abschnitt 2.2. beschriebene Veraschungsgang durchgeführt und anschließend die Calciumkonzentration im AAS bestimmt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 5: Calciumbestimmung mit der AAS

Ca-salz	Einwaage (mg)	Ca-konz. erwartet (mg/100mg)	Ca-konz. AAS (mg/100mg)	Erfasstes Ca (%)
CaCO_3	1,737		38,3	95,7
"	1,703		36,7	91,7
"	1,713		38,9	97,3
		40,0	$\bar{x}$ 38,0	$\bar{x}$ 95,0
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$	1,706		36,4	95,7
(OH)	1,584		36,1	91,7
"	1,777		37,0	97,3
		39,8	$\bar{x}$ 36,5	$\bar{x}$ 94,9
CaSO_4	1,854		24,0	102,7
($2\text{H}_2\text{O}$)	1,765		24,4	104,3
"	1,968		24,2	103,4
		23,4	$\bar{x}$ 24,2	$\bar{x}$ 103,6

Die Ergebnisse lagen bei dieser Methode der Calciumbestimmung bei allen drei Calciumverbindungen innerhalb einer 5 % Streuung.

2.4.3. Ergebnisse

Vergleichen wir die flammenphotometrische Calciumbestimmung mit der Bestimmung im Atomabsorptionsspektrometer, so stellen wir fest, daß mit der AAS über 95 % des vorgegebenen Calciums in allen drei analysierten Verbindungen erfaßt wurden, während mit der Flammenphotometrie nach vorheriger Veraschung mit Schwefelsäure nur rund 80 % bestimmt werden konnten (vergl. Tab. 6).

Dieser Unterschied kommt dadurch zustande, da bei der Veraschung organischen Gallensteinmaterials mit Schwefelsäure ein Teil des im Stein enthaltenen Calciums in unlösliches Calciumsulfat überführt und damit der flammenphotometrischen Bestimmung entzogen wird.

Die Calciumbestimmung mit der AAS stellt somit eine bedeutende Verbesserung in der Mikroanalyse von Gallensteinen dar.

Tabelle 6: Wiederfindungsrate des Calciums

	Flammen- photometer	AAS
CaCO_3	85,5 %	95,0 %
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	76,6 %	94,9 %
$\text{CaSO}_4(2\text{H}_2\text{O})$	86,4 %	105,6 %

2.5. Oberflächen- und Gewichtsbestimmung der Gallensteine

Da wir die Abhängigkeit der Auflösungsgeschwindigkeit der Gallensteine von ihrer Oberfläche und ihrem Gewicht untersuchen wollten, wurden diese beiden Größen folgendermaßen bestimmt:

2.5.1. Oberfläche

Der meist facettierte Gallenstein wurde mit Aluminiumfolie exakt umwickelt. Dabei ist genaustens darauf geachtet worden, daß keinerlei Überlappungen und Falten der Folie an den Kanten entstanden. Überstehende Folie wurde mit einer kleinen Schere entfernt.

Danach wurde die Folie mit einer Pinzette vom Gallenstein abgenommen und auf Millimeterpapier glattgestrichen. Nach Markierung des Folienrandes auf dem Papier, konnte die Oberfläche in mm^2 ausgezählt werden.

Auf diese Weise wurde für jeden Stein die Oberfläche als Mittelwert aus 5 Bestimmungen ermittelt.

Die Schwankungen variierten je nach Größe und Form des Steines um durchschnittlich 10 %.

2.5.2. Gewicht

Der getrocknete Gallenstein, dessen Oberfläche zuvor bestimmt wurde, ist für mehrere Tage in Ringer-Lösung gelegt worden. Tägliche Wägungen zeigten eine Zunahme des Steingewichtes bis eine maximale Absättigung erfolgt war. Der Gallenstein zeigte danach über mehrere Tage keine Gewichtsänderung mehr (s. Abb. 5).

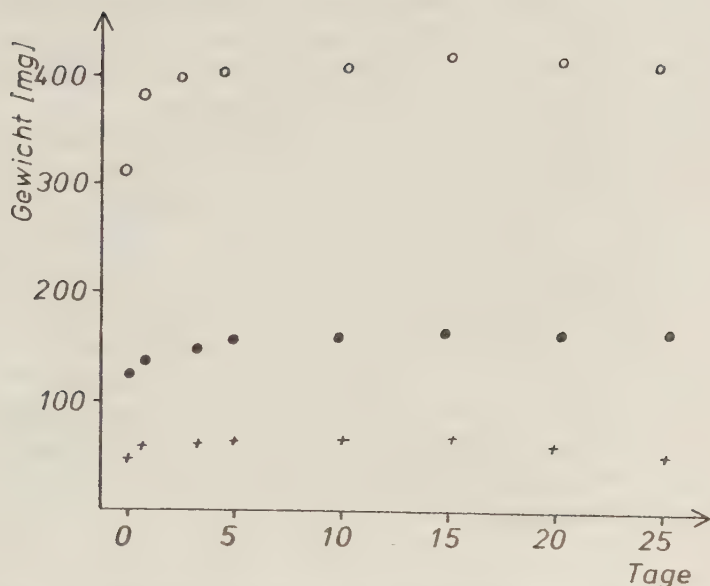


Abb. 5: Gewichtsänderung der trockenen Gallensteine nach Einlegen in Ringer-Lösung am Beispiel von 3 Gallensteinen.

2.6. Cholesterolbestimmung in der Galle

Das in der Galle enthaltene Cholesterol wurde mit KOH in Äthanol verseift und mit Petroläther extrahiert. Darauf wurde das Cholesterol mit Digitonin gefällt und in einen Cholesterol-Digitonin-Komplex überführt. Nach Waschen mit Aceton und Diäthyläther wurde dieser Komplex in Eisenchlorid-Essigsäure gelöst.

Um den Cholesterolverlust zu erfassen, der während des Analysenganges auftrat, wurde mit einem "inneren Standard" gearbeitet. Dabei wurde zu Beginn der Analyse jeder Probe und einem Cholesterolstandard eine bekannte Menge radioaktiv markiertes H^3 -Chol-

esterol (in Äthanol gelöst) zugegeben, dessen Masse vernachlässigt werden kann, da sie sehr gering ist. Gleichzeitig wurden H^3 -Cholesterolproben in Packard-Röhrchen gegeben.

Am Ende des Analysenganges wurde ein Teil jeder Probe entnommen und in Packard-Röhrchen die Radioaktivität gemessen. Dem übrigen Teil des in Eisenchlorid-Essigsäure gelösten Cholesterol-Digitonin-Komplexes wurde konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und die Cholesterolkonzentration photometrisch bestimmt (Kiliani-Reaktion).

Es besteht so die Möglichkeit, den mit dem "inneren Standard" bestimmten Cholesterolverlust bei der Berechnung der Cholesterolkonzentration aus der photometrischen Bestimmung zu berücksichtigen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Auflösung von Gallensteinen in vitro

3.1.1. Auflösung in Galle

3.1.1.1. Material

Mit Hilfe der folgenden Versuchsanordnung, sollte untersucht werden, inwieweit Calciumgehalt, Oberfläche und Gewicht von Gallensteinen deren Auflösungsgeschwindigkeit in einer im Labor hergestellten künstlichen Galle beeinflussen.

Nach Untersuchungen von Roes und Weis (59) haben die bei der Cholezystektomie eines Patienten entnommenen Gallensteine gleicher makroskopischer Struktur identische Zusammensetzung.

Bei 14 Patienten mit multiplen Gallensteinen konnte deshalb je ein Stein auf seinen Calciumgehalt analysiert werden (s. Abschnitt 2.2.4.), während von den restlichen Gallensteinen insgesamt 41, nach Bestimmung von Oberfläche und Gewicht, für diesen Teil der Studie verwendet wurden.

In Tabelle 7 sind die Angaben über Calciumgehalt, Oberfläche und Gewicht der Steine vor Versuchsbeginn zusammengestellt.

Tabelle 7: Calciumgehalt, Oberfläche und Gewicht
der verwendeten Gallensteine vor Ver-
suchsbeginn

Stein- Nr.	Ca (mg%)	Oberfläche (mm ²)	Gewicht (mg)
1	0,0	336	404
2	0,0	171	135
3	0,0	129	99
4	0,0	131	85
5	0,0	87	45
6	0,0	61	22
7	0,0	411	674
8	0,0	270	309
9	0,0	83	33
10	0,0	77	43
11	0,0	279	356
12	0,0	439	648
13	0,0	420	625
14	0,0	285	368
15	0,0	316	407
16	0,0	244	292
17	0,5	143	111
18	0,5	142	126
19	1,6	266	296
20	1,6	140	111
21	1,7,	123	95
22	1,7	274	366

Fortsetzung von Tabelle 7:

Stein- Nr.	Ca (mg%)	Oberfläche (mm ²)	Gewicht (mg)
23	7,6	135	72
24	7,6	80	43
25	7,6	472	870
26	7,6	156	110
27	7,6	157	102
28	8,5	120	69
29	8,5	76	33
30	8,5	474	886
31	13,6	273	320
32	13,6	274	409
33	13,6	388	693
34	13,6	145	145
35	13,6	446	886
36	13,6	274	402
37	13,6	187	243
38	13,6	195	222
39	16,9	142	120
40	28,5	80	59
41	28,5	70	53

3.1.1.2. Versuchsaufbau

In einen verschließbaren Plastiktubus wurde an Boden und Deckel jeweils eine Kanüle (Durchmesser 0,9 mm) eingesteckt.

Ein Silikonschlauch, der durch eine Walzenpumpe geführt wurde, verband obere und untere Öffnung des Tubus miteinander.

Es ist so ein System geschaffen worden, in dem eine künstliche Galle durch den Antrieb der Pumpe zirkulieren und dabei den im Tubus liegenden Gallenstein umspülen konnte.

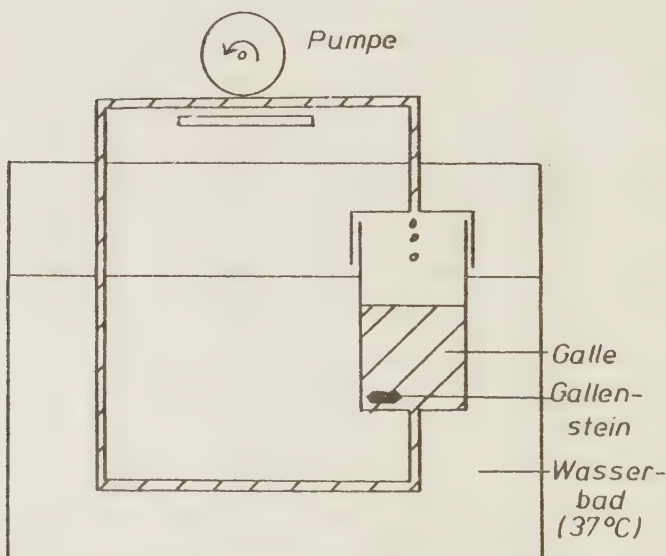


Abb. 6: Versuchsaufbau

Um die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurden Tubus und Schläuche gemäß Abb. 6 in ein Wasserbad gestellt, dessen Temperatur auf 37°C konstant gehalten wurde.

3.1.1.3. Zusammensetzung der künstlichen Galle

Wie in Abschnitt 1.3.1. bereits beschrieben wurde, versucht man bei der medikamentösen Gallensteinauflösung mit Chenodesoxycholsäure das molare Verhältnis von Gallensäuren, Phospholipid und Cholesterol so zu beeinflussen, daß es sich den physiologischen Gegebenheiten annähert. Es besteht somit die Möglichkeit auch bereits kristallisiertes Cholesterol (z.B. in Gallensteinen) wieder in Lösung zu bringen.

Nach Angaben von Admirand und Small (1) enthält eine normale menschliche Gallenblasengalle:

Gallensäuren	135,2 ± 64,6 mmol/l
Lezithin	38,0 ± 19,6 mmol/l
Cholesterol	11,1 ± 5,9 mmol/l

Für unsere in-vitro-Auflösung von Gallensteinen stellten wir im Labor eine Gallenflüssigkeit her, die in ihrer Gallensäuren- und Lezithinkonzentration diesen Angaben entsprach. Cholesterol war jedoch nicht enthalten.

Zur Herstellung von 200 ml künstlicher Galle verwendeten wir:

Chenodesoxycholsäure p.a.	5,8 g	67,3 mmol/l
Cholsäure p.a.	5,8 g	70,0 mmol/l
Lezithin p.a.	6,0 g	37,0 mmol/l
Penizillin G	1,0 g	
Ringer-Lösung	200 ml	
mit KOH-Platzchen pH ad 7,4		

In einen 200 ml-Standkolben wurden Cholsäure und Chenodesoxycholsäure unter ständigem Rühren und mäßigem Erwärmen in Ringer-Lösung gelöst. Das Lezithin ist in einem mit Ringer-Lösung ge-

füllten Becherglas mit einem Spatel zerdrückt und anschließend in den Standkolben überführt worden. Um ein Keimwachstum in der Flüssigkeit zu verhindern, wurde Penizillin G zugegeben.

Das Gemisch aus Cholsäure, CDC, Lecithin und Penizillin in Ringer-Lösung hatte eine trübe Färbung und ein Teil der Substanzen war noch nicht gelöst (pH 5).

Daraufhin wurde mit Kaliumhydroxyd-Plätzchen der pH der Flüssigkeit auf 7,4 angehoben. Bei pH 7 ging die Trübung der Flüssigkeit zurück und es entstand eine klare Lösung, die für die in-vitro-Experimente verwendet wurde.

3.1.1.4. Durchführung

Vor Versuchsbeginn wurde die Umlaufgeschwindigkeit der künstlichen Galle an der Pumpe auf 30 ml pro Stunde eingestellt. Wir erreichten so, daß die zu Versuchsbeginn eingesetzte Flüssigkeitsmenge von 30 ml künstlicher Galle innerhalb einer Stunde einmal umgewälzt wurde.

Nach Einfüllen der Galle in den in Abb. 6 beschriebenen Tubus, legten wir den zu untersuchenden Gallenstein mit einer Pinzette auf dessen Boden.

Die Versuchsdauer betrug 10 Tage.

Zur Gewichtsbestimmung wurde der Stein jeden zweiten Tag mit einer Pinzette aus dem Tubus entnommen und gewogen. Zur Bestimmung der Konzentrationsänderung von Calcium und der Cholesterolzunahme in der Galle, sind am ersten und am zehnten Tag Proben entnommen worden, die der chemische Analyse (s. Abschnitt 2.) zugeführt wurden.

3.1.2. Ergebnisse

3.1.2.1. Gewichtsänderung der Gallensteine

Während des zehntägigen Versuchsverlaufs wurde jeden zweiten Tag das Gewicht der Steine bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 8:

Stein-Nr.	Steingewicht in mg am					
	o.Tag	2.Tag	4.Tag	6.Tag	8.Tag	10.Tag
1	404	378	352	341	333	317
2	135	123	108	105	100	90
3	99	87	70	62	60	55
4	85	76	65	60	56	47
5	45	38	31	23	21	14
6	22	18	13	10	8	5
7	674	634	602	588	564	-
8	309	277	263	256	252	241
9	33	19	14	-	7	3
10	43	40	38	-	33	25
11	356	343	330	-	329	319
12	648	632	-	620	619	618
13	625	607	-	602	594	593
14	368	351	-	336	331	325
15	407	389	-	381	372	371
16	292	274	-	274	267	262
17	111	96	81	69	63	-
18	126	114	-	102	98	95

Fortsetzung Tabelle 8:

Stein-Nr.	Steingewicht in mg am					
	o.Tag	2.Tag	4.Tag	6.Tag	8.Tag	10.Tag
19	296	275	265	254	253	250
20	111	105	-	100	96	94
21	95	92	86	78	75	-
22	366	336	321	303	297	290
23	72	61	55	47	45	-
24	43	42	34	-	31	27
25	870	859	-	850	845	842
26	110	102	-	88	88	84
27	102	96	-	89	86	83
28	69	61	52	48	44	-
29	33	30	27	-	26	18
30	886	877	-	868	863	850
31	320	317	312	318	306	294
32	409	402	-	390	384	382
33	693	691	-	681	681	680
34	145	141	-	140	141	140
35	886	861	-	857	856	850
36	402	397	-	398	397	386
37	243	242	-	242	240	232
38	222	220	-	220	214	207
39	120	110	115	111	112	116
40	59	59	60	60	63	64
41	53	54	54	-	53	53

Zur Bestimmung der relativen Gewichtsabnahme der Gallensteine, wurde das Steingewicht des achten Tages mit dem Ausgangsgewicht verglichen. Wir wählten den achten Versuchstag, da hier für alle untersuchten Gallensteine Gewichtsangaben vorlagen. Die Angabe der relativen Gewichtsabnahme erfolgte somit als Gewichtsänderung der Steine in Prozent ihres Ausgangsgewichtes während 8 Tagen (%/8Tage).

Tabelle 9: Gewichtsänderung der Gallensteine (ΔG)
in %/8Tage

Stein-Nr.	ΔG (%/8d)	Stein-Nr.	ΔG (%/8d)	Stein-Nr.	ΔG (%/8d)
1	-17,6	15	- 8,6	29	-21,2
2	-25,9	16	- 8,5	30	- 2,5
3	-39,4	17	-43,2	31	- 4,3
4	-34,1	18	-22,2	32	- 6,1
5	-53,4	19	-14,5	33	- 1,7
6	-63,6	20	-13,5	34	- 2,7
7	-16,3	21	-21,1	35	- 3,3
8	-18,4	22	-18,8	36	- 1,2
9	-78,8	23	-37,5	37	- 1,2
10	-23,2	24	-27,9	38	- 3,6
11	- 7,6	25	- 2,8	39	- 6,6
12	- 4,4	26	-20,0	40	+ 6,7
13	- 4,9	27	-15,7	41	0,0
14	-10,0	28	-36,2		

3.1.2.2. Einfluß von Calciumgehalt, Oberfläche und Gewicht der Gallensteine auf die Lösungsgeschwindigkeit

Die Diagramme 3 und 4 zeigen die Beziehung zwischen dem Calciumgehalt der Steine und ihrem Gewichtsverlust. Je größer der Calciumgehalt, um so geringer ist die relative Gewichtsabnahme.

Diagramm 5 und 6 verdeutlichen den Zusammenhang zwischen Ausgangsoberfläche und relativer Gewichtsabnahme. Diagramm 7 und 8 geben die Beziehung zwischen Ausgangsgewicht und relativer Gewichtsabnahme wieder.

Sowohl mit größer werdender Steinoberfläche, als auch mit steigendem Gewicht nimmt die relative Gewichtsabnahme, d.h. die Auflösungsgeschwindigkeit der Steine ab.

Aus den Diagrammen 3, 5 und 7 vermuteten wir einen exponentiellen Zusammenhang zwischen den beobachteten Merkmalen der Gallensteine (Calciumgehalt, Oberfläche, Gewicht) und der relativen Gewichtsabnahme. In den Diagrammen 4, 6 und 8 wurden daher die Werte der relativen Gewichtsabnahme (s. Tab. 9) logarithmisch transformiert aufgetragen.

Zwei Steine, für die keine Gewichtsänderung (Stein-Nr. 41, Tab. 9) bzw. eine geringe Gewichtsabnahme (Stein-Nr. 40, Tab. 9) gemessen wurde, konnten bei der logarithmischen Transformation und der Berechnung der partiellen Korrelationen nicht berücksichtigt werden. Für diese beiden Fälle ist in der von uns gewählten Form der Angabe der Gewichtsänderung der Logarithmus mathematisch nicht definierbar.

Die Diagramme 3 bis 8 zeigen uns, daß nicht nur eines der drei beobachteten Steinmerkmale die Ge-

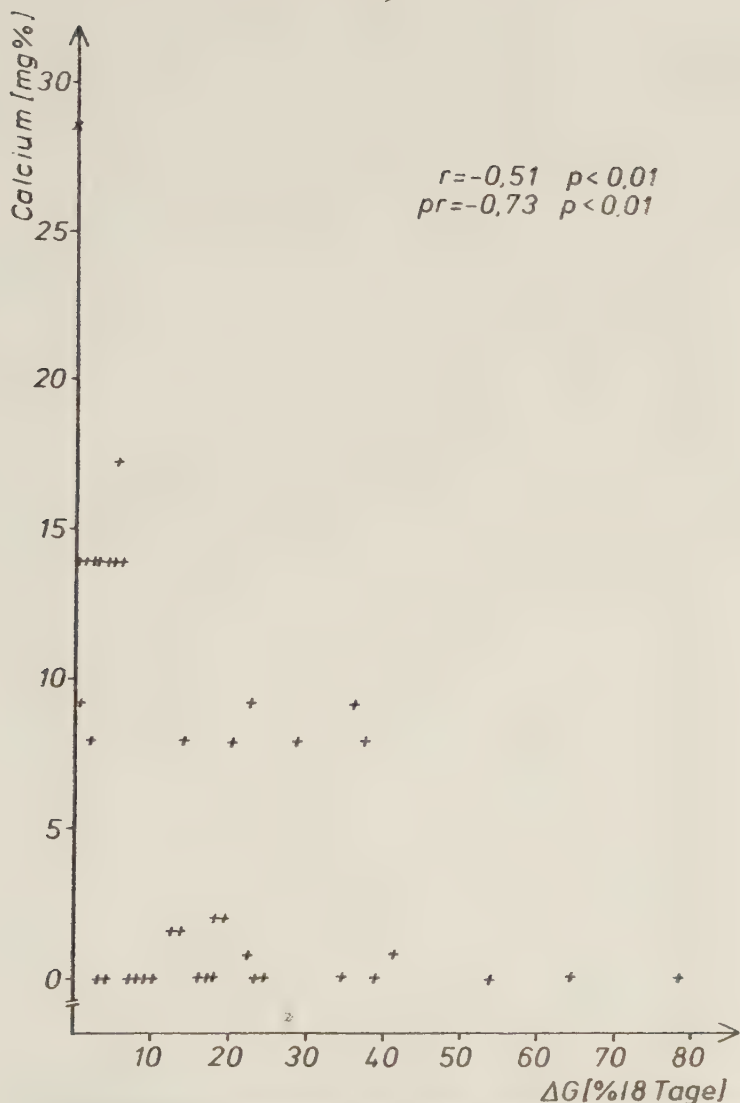


Diagramm 3: Änderung der relativen Gewichtsabnahme ΔG in Abhängigkeit vom Calciumgehalt der Gallensteine. Mit steigendem Calciumgehalt verringert sich die Auflösungsgeschwindigkeit der Gallensteine.

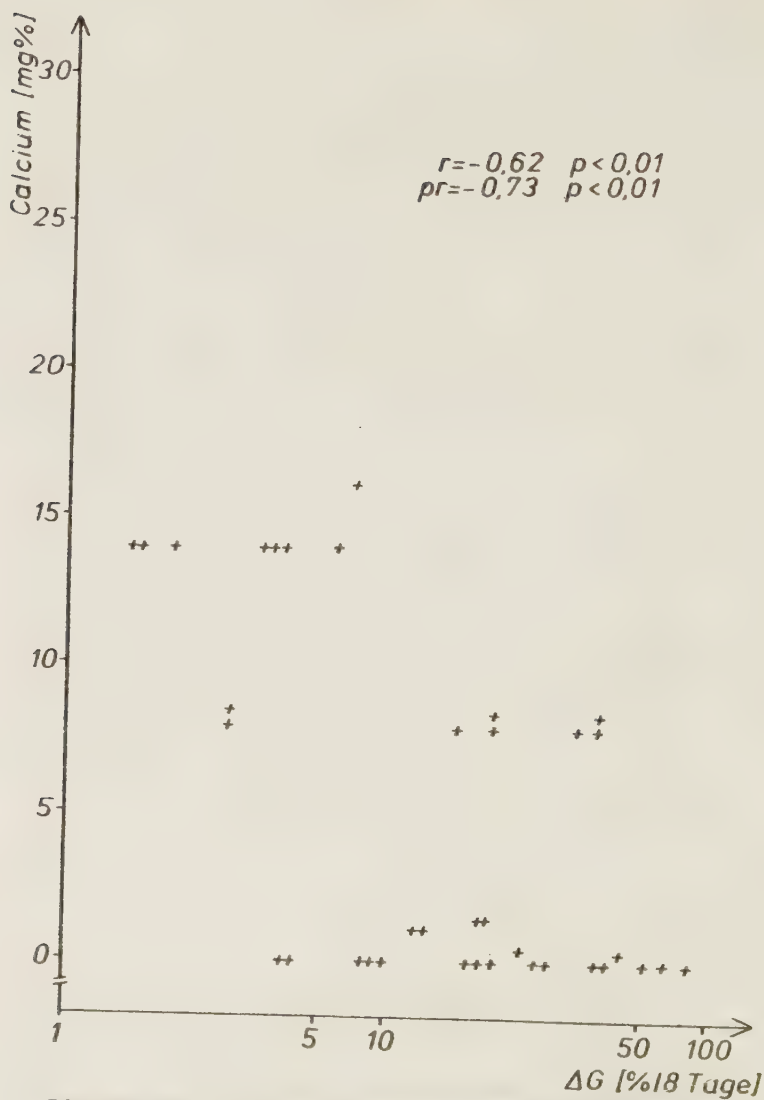


Diagramm 4: Änderung der relativen Gewichtsabnahme ΔG in Abhängigkeit vom Calciumgehalt der Gallensteine (logarithmische Transformation).

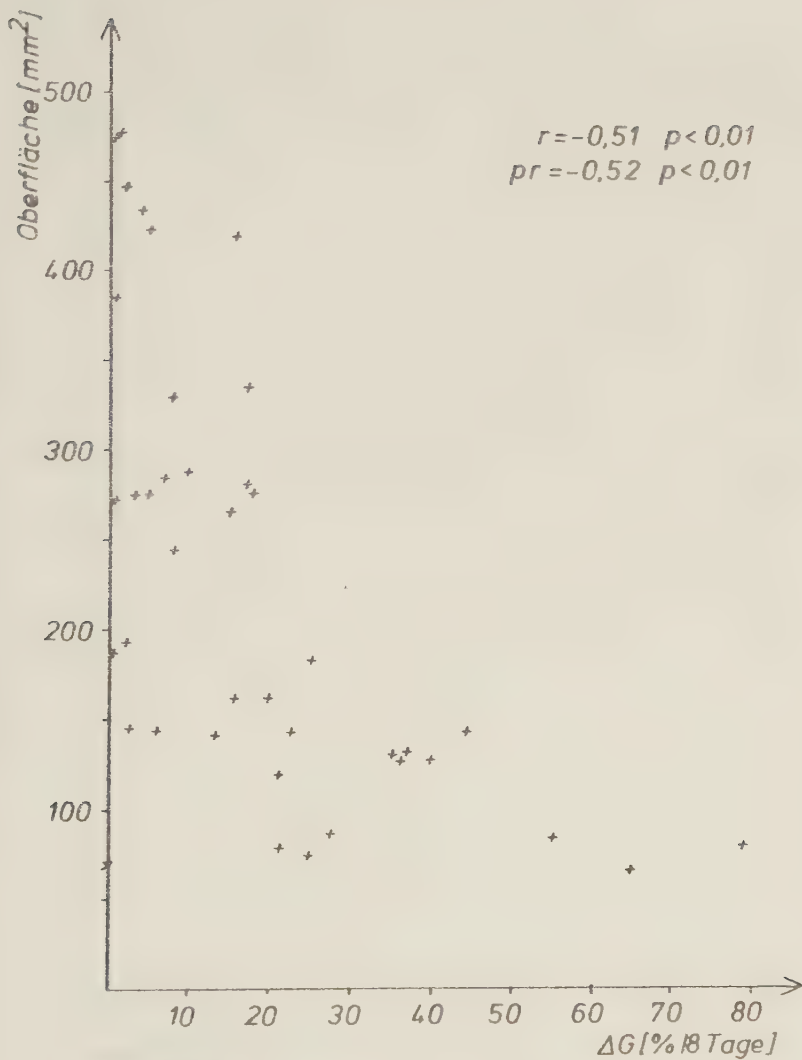


Diagramm 5: Änderung der relativen Gewichtsabnahme ΔG in Abhängigkeit von der Oberfläche der Gallensteine. Mit zunehmender Oberfläche verringert sich die Auflösungsgeschwindigkeit der Gallensteine.

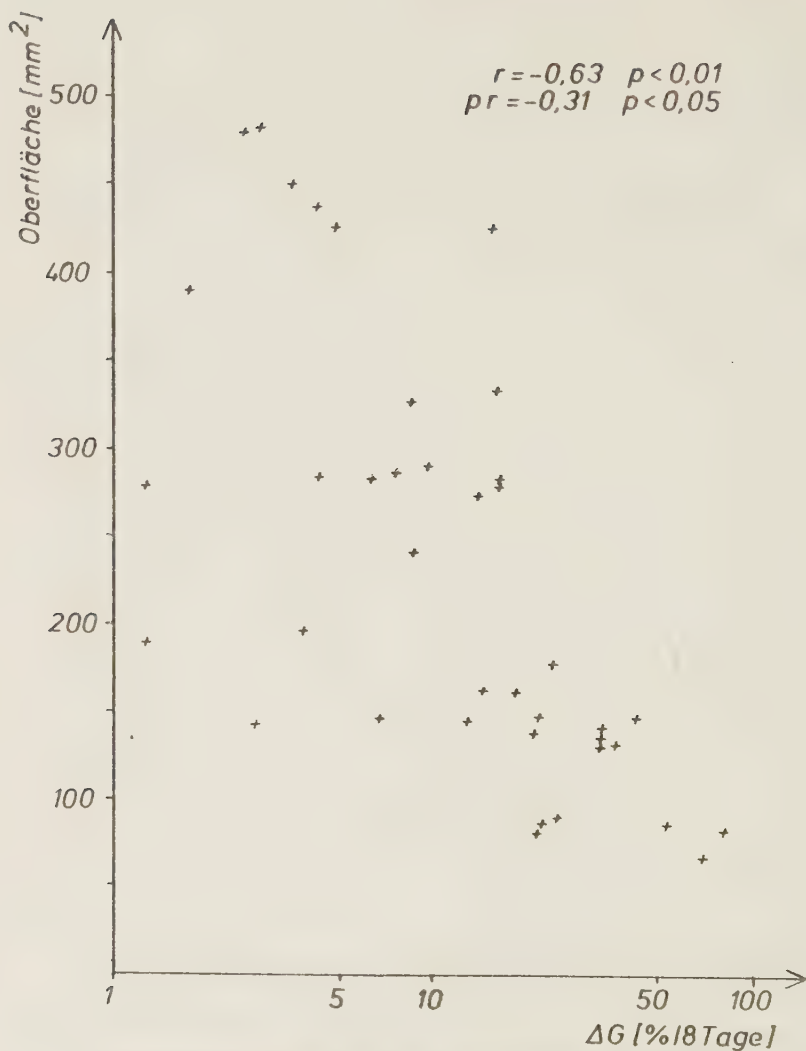


Diagramm 6: Änderung der relativen Gewichtsabnahme ΔG in Abhängigkeit von der Oberfläche der Gallensteine (logarithmische Transformation).

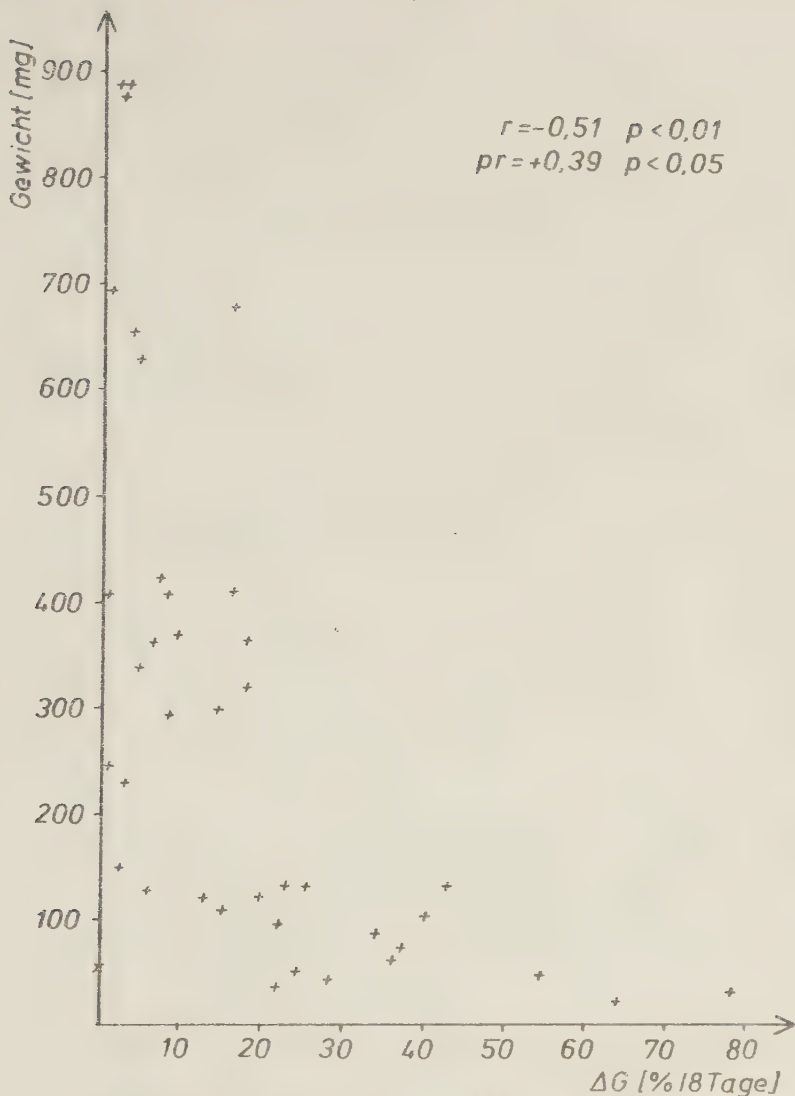


Diagramm 7: Änderung der relativen Gewichtsabnahme ΔG in Abhängigkeit vom Gewicht der Gallensteine. Mit steigendem Gewicht verringert sich die Auflösungsgeschwindigkeit der Gallensteine.

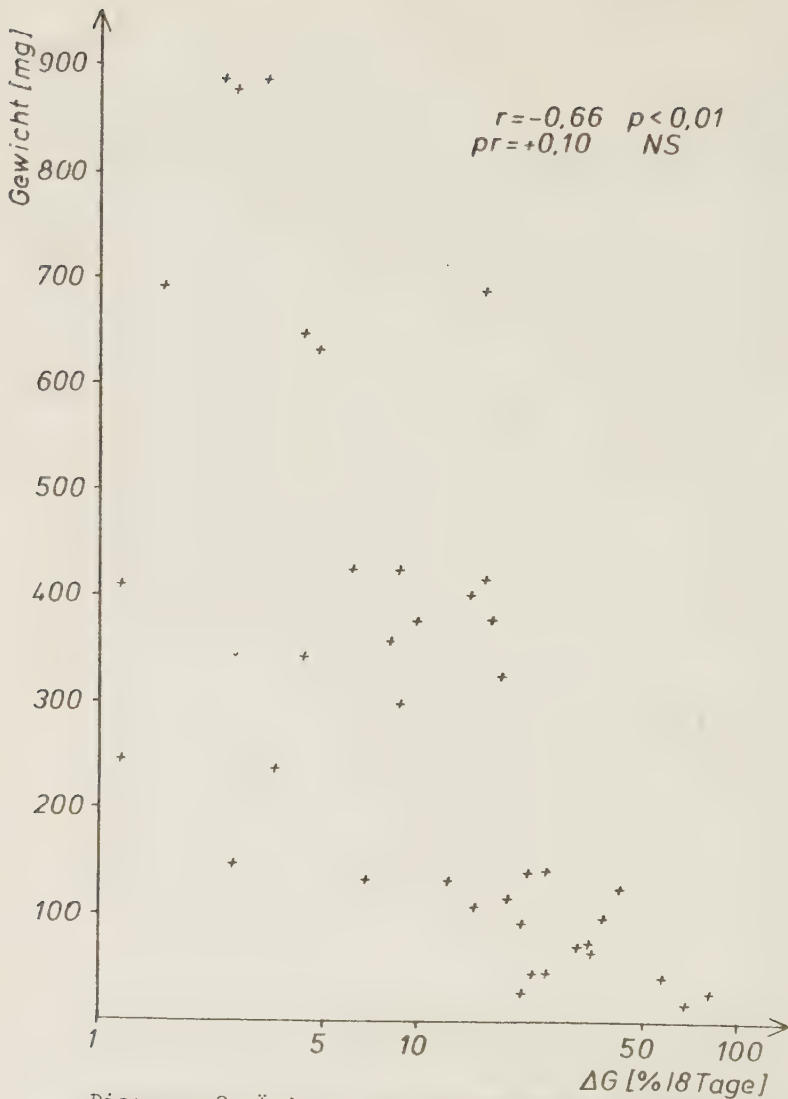


Diagramm 8: Änderung der relativen Gewichtsabnahme ΔG in Abhängigkeit vom Gewicht der Gallensteine (logarithmische Transformation).

wichtsabnahme alleine beeinflußt, sondern daß alle drei Merkmale gemeinsam auf das Lösungsverhalten eines Gallensteines einwirken.

Neben der Korrelation (r) zwischen dem beobachteten Merkmal und der Gewichtsabnahme wurde deshalb auch die partielle Korrelation (pr) bestimmt.

Bei der Berechnung der partiellen Korrelation geht man von der Vorstellung aus, daß zwei der drei die Steinauflösung beeinflussenden Merkmale (z.B. Oberfläche und Gewicht) für alle untersuchten Fälle konstant gehalten werden, während nur die Änderung des dritten Merkmals (z.B. Calciumgehalt) und dessen Einfluß auf die Gewichtsänderung beobachtet wird.

In unserer Versuchsserie konnten folgende Einflüsse auf die Auflösungsgeschwindigkeit von Cholesterolgallensteinen in einer künstlichen Galle *in vitro* festgestellt werden:

3.1.2.3. Calciumgehalt der Gallensteine

Aus den Diagrammen 5 und 4 kann mit der Bestimmung der partiellen Korrelation eine Aussage darüber gemacht werden, wie bei Steinen mit gleicher Oberfläche und gleichem Gewicht die relative Gewichtsabnahme von dem untereinander verschiedenen Calciumgehalt beeinflußt wird.

Nach unseren Beobachtungen ergibt sich sowohl bei der Betrachtung der Originalwerte der relativen Gewichtsabnahme, als auch ihrer logarithmischen Transformation ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,01$) zwischen dem Calciumgehalt der Gallensteine und deren relativen Gewichtsabnahme.

Steine mit hohem Calciumgehalt (13,6 mg%) lösten sich langsamer auf als Steine mit niedrigem Calciumgehalt (7,6 und 8,5 mg%) oder solchen, die calciumfrei waren. ($pr_3 = -0,73$, $pr_4 = -0,73$ vergl. Tab. 10. Die Indizes beziehen sich auf die Nummern der Diagramme).

3.1.2.4. Oberfläche der Gallensteine

Sowohl aus Diagramm 5, als auch aus Diagramm 6 ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ausgangsoberfläche und relativer Gewichtsabnahme ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$, vergl. Tab. 10).

Bei Betrachtung der relativen Gewichtsabnahme, lösen sich Steine mit großer Oberfläche langsamer auf, als solche mit kleiner Oberfläche ($pr_5 = -0,52$, $pr_6 = -0,31$, vergl. Tab 10).

Auch hier ist es sinnvoll die partiellen Korrelationen zu betrachten, da hierbei Einflüsse von seiten des Calciumgehaltes und des Steingewichtes auf die Gewichtsabnahme berücksichtigt sind.

3.1.2.5. Gewicht der Gallensteine

Betrachtet man die Korrelation (r) zwischen Ausgangsgewicht der Gallensteine und deren relativen Gewichtsabnahme in Diagramm 7 und 8, so besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen ($p < 0,01$).

Mit größerem Steingewicht verringert sich die relative Gewichtsabnahme, d.h. der Stein löst sich langsamer auf ($r_7 = -0,51$, $r_8 = -0,66$, vergl. Tab.10).

Bei der Betrachtung der partiellen Korrelationen (pr) in Diagramm 7, ergab sich ein statistisch auffälliger Zusammenhang zwischen Steingewicht und Gewichtsabnahme ($p < 0,05$). Interessanterweise ist hier der Korrelationskoeffizient pr_7 positiv,

was bedeuten würde, daß bei Gallensteinen mit annähernd gleichem Calciumgehalt und gleicher Oberfläche aber unterschiedlichem Gewicht, sich diejenigen Steine schneller auflösen, welche ein höheres Ausgangsgewicht besitzen ($pr_7 = +0,39$). Dieser Zusammenhang wird beim Vergleich der Tabellen 7 und 9 für folgende Steine erkennbar: Stein-Nr. 24/29; 26/27; 19/22; 31/32; 32/36. Es ist hier nochmals deutlich geworden, daß das Lösungsverhalten der Gallensteine nicht nur von einem untersuchten Merkmal abhängt, sondern daß alle drei Variablen (Calcium, Oberfläche, Gewicht) einen gemeinsamen Einfluß ausüben. Dies kann durch die Betrachtung der partiellen Korrelationen gut erfaßt werden.

3.1.2.6. Gemeinsamer Einfluß von Oberfläche und Gewicht auf das Lösungsverhalten

Aus der Betrachtung der Korrelationskoeffizienten (r) in Tabelle 10 wird deutlich, daß das Lösungsverhalten der Gallensteine in vitro von deren Calciumgehalt, Oberfläche und Gewicht beeinflusst wird. Steine mit gleichem Calciumgehalt zeigen mit größer werdender Oberfläche und damit steigendem Gewicht eine Verringerung der relativen Gewichtsabnahme.

Dieser gemeinsame Einfluß von Oberfläche und Gewicht auf die Auflösungsgeschwindigkeit der Steine wird an der folgenden Beobachtung deutlich, die wir an 6 Steinen eines Patienten (d.h. Steinen mit gleicher chemischer Zusammensetzung) mit unterschiedlichem Gewicht und unterschiedlicher Oberfläche machen konnten (Stein-Nr. 1 bis 6 in Tab. 7 und 8).

Für jeden dieser Steine wurde die mittlere tägliche

Tabelle 10: Korrelation (r) und partielle Korrelation (pr) zwischen den beobachteten Merkmalen der Gallensteine und der relativen Gewichtsabnahme.

a) Diagramm 3,5,7 | Gewichtsabnahme (Originalwerte)
(%/8 Tage)

n= 41 Steine	r	pr
Calciumgehalt	-0,51 ($p < 0,01$)	-0,73 ($p < 0,01$)
Oberfläche	-0,51 ($p < 0,01$)	-0,52 ($p < 0,01$)
Gewicht	-0,51 ($p < 0,01$)	+0,39 ($p < 0,05$)

b) Diagramm 4,6,8, | Gewichtsabnahme (logarithmisch)
(%/8 Tage)

n= 39 Steine	r	pr
Calciumgehalt	-0,62 ($p < 0,01$)	-0,73 ($p < 0,01$)
Oberfläche	-0,63 ($p < 0,01$)	-0,31 ($p < 0,05$)
Gewicht	-0,66 ($p < 0,01$)	+0,10 (NS)

relative Gewichtsabnahme während 8 Tagen aus den in Tabelle 9 für Stein-Nr. 1 bis 6 angegebenen Werten der relativen Gewichtsänderung bestimmt. Ferner wurde die mittlere absolute Gewichtsabnahme pro Tag aus den in Tabelle 8 für die gleichen Steine angegebenen Werten des achten Tages errechnet.

In Diagramm 9 ist der Verlauf der Gewichtsabnahme in bezug auf das Ausgangsgewicht der Steine über acht Tage dargestellt. Wir sehen, daß mit steigendem Gewicht und größerer Oberfläche der Steine die mittlere tägliche relative Gewichtsabnahme in $\%/d$ kleiner wird, d.h. daß große Steine in der Zeiteinheit in bezug auf ihr Ausgangsgewicht weniger Substanz abgeben, als kleine Steine. Ebenfalls wird deutlich, daß die tägliche absolute Gewichtsabnahme in mg/d mit steigendem Gewicht und größerer Oberfläche der Gallensteine zunimmt.

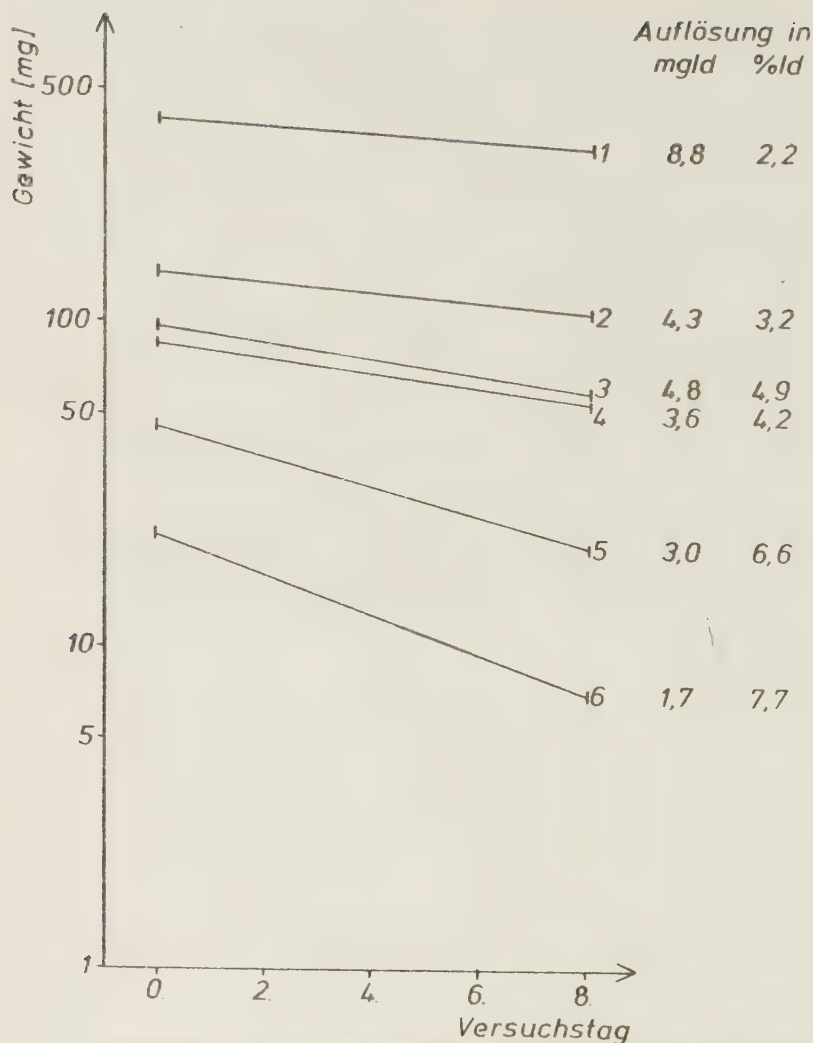


Diagramm 9: Mittlere tägliche absolute und relative Gewichtsabnahme von Gallensteinen gleicher Zusammensetzung in vitro am Beispiel der Steine 1 - 6 der Tabellen 7 und 8.

Bei 20 Gallensteinen bestimmten wir zu Beginn und am Ende der zehntägigen Versuchsdauer Gewicht und Oberfläche.

Gemeinsames Merkmal dieser Steine war, daß in ihnen kein Calcium nachgewiesen wurde.

In Tabelle 11 sind die für die einzelnen Steine ermittelten Gewichts- und Oberflächenänderungen zusammengestellt. Aus der graphischen Darstellung in Diagramm 10 können wir erkennen, daß ein statistisch signifikanter, linearer Zusammenhang zwischen der Abnahme der Steinoberfläche und der Gewichtsabnahme bei der Gallensteinauflösung in vitro besteht ($r = 0,55$, $p < 0,01$).

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Oberflächenänderung (ΔO) und Gewichtsänderung (ΔG) bei calciumfreien Gallensteinen.

Lfd. Nr.	ΔO (mm ²)	ΔG (mg)	Lfd. Nr.	ΔO (mm ²)	ΔG (mg)
1	58	87	11	40	32
2	50	45	12	42	43
3	49	38	13	36	36
4	47	44	14	16	30
5	44	31	15	24	12
6	39	17	16	31	15
7	28	68	17	26	22
8	30	18	18	20	12
9	21	37	19	11	18
10	39	30	20	13	28

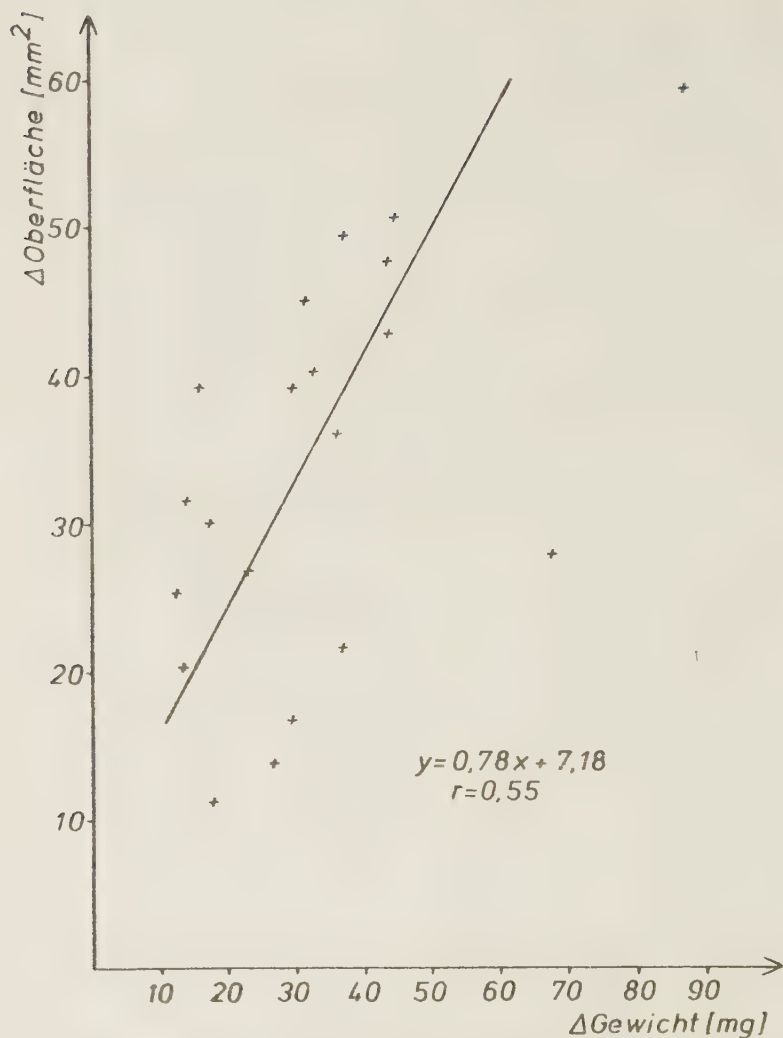


Diagramm 10: Die Gallensteinauflösung in vitro zeigte, daß die Oberflächenabnahme der Gallensteine in einem Bereich von 10 - 50 mm² in linearer Beziehung zur Gewichtsabnahme steht.

3.2. Lösungsverhalten und Gallenfluß

Theoretisch beeinflußt auch die Strömungsgeschwindigkeit der Galle die Auflösungsrate der Gallensteine (47). Um diesen Effekt nachzuweisen, wurden folgende Versuche durchgeführt:

3.2.1. Material und Durchführung

Bei 6 Gallensteinen gleicher Zusammensetzung wurden Gewicht und Oberfläche bestimmt. In je einen verschließbaren 100 ml-Erlenmeyerkolben wurden 30 ml künstliche Gallenflüssigkeit gegeben und ein Gallenstein auf den Boden des Glases gelegt. Die Kolben wurden verschlossen und 10 Tage in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Während dieser Zeit wurden die Kolben und die sich darin befindende Flüssigkeit nicht bewegt! Das Gewicht der Gallensteine wurde zu Versuchsbeginn und am 10. Tag bestimmt.

Aus der Gewichts Differenz berechneten wir die mittlere tägliche relative Gewichtsabnahme. Diese verglichen wir mit der täglichen relativen Gewichtsabnahme von 8 Gallensteinen gleicher Zusammensetzung, die in zirkulierender Galle (Umlaufgeschwindigkeit: 30 ml/h) gemessen worden war.

3.2.2. Ergebnisse

Wir untersuchten an insgesamt 14 Gallensteinen gleicher Zusammensetzung den Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit der Galle auf die Auflösungsgeschwindigkeit der Gallensteine in vitro. Sechs Steine, die in nicht bewegter Gallen-

flüssigkeit legen, zeigten nach 10 Tagen eine deutlich geringere relative Gewichtsabnahme, als 8 Gallensteine, die während 10 Tagen kontinuierlich von einer zirkulierenden künstlichen Galle umspült wurden (vergl. Tab. 12 und Diagramm 11).

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen Umlaufgeschwindigkeit der Galle und der täglichen relativen Gewichtsabnahme (ΔG).
°Zahlen in Klammern entsprechen den Stein-Nr. in Tabelle 7 und 9.

Lfd. Nr.		Fläche (mm ²)	Gewicht o.Tag (mg)	Gewicht 10.Tag (mg)	G (%/d)
1	Ruhende Galle	161	150	142	0,55
2		218	242	224	0,75
3		189	203	190	0,65
4		139	101	89	1,20
5		133	96	81	1,55
6		139	117	95	1,85
7 (1)°	Zirkulierende Galle	336	404	317	2,80
8 (2)		171	135	90	3,35
9 (3)		129	99	55	4,45
10 (4)		131	85	47	4,45
11 (5)		87	45	14	6,90
12 (6)		61	22	5	7,73
13 (11)		279	356	319	1,05
14 (16)		244	292	262	1,05

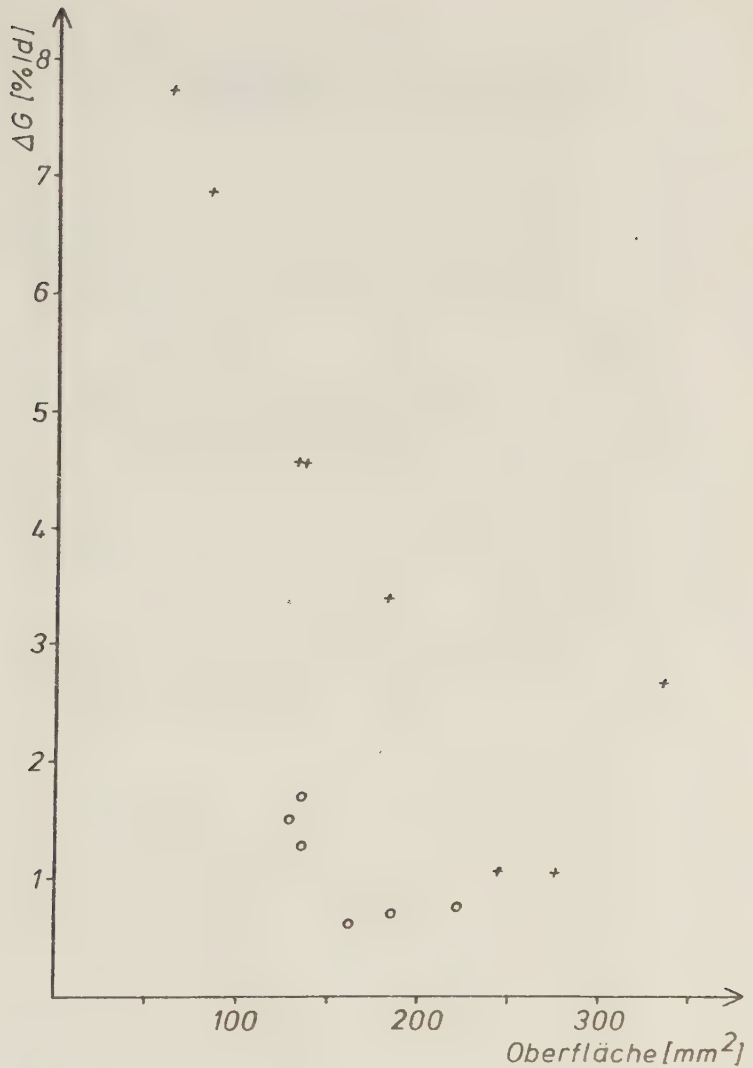


Diagramm 11: Änderung der täglichen relativen Gewichtsabnahme ΔG in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit der Galle, bei Steinen gleicher Zusammensetzung:

- in ruhender Galle
- + in bewegter Galle

3.3. Änderungen in der Gallenzusammensetzung während der Steinauflösung

3.3.1. Cholesterol

Wie in Abschnitt 3.1.1.3. beschrieben, stellten wir eine künstliche Galle her, die Gallensäuren, Lecithin und Penizillin in Ringer-Lösung enthielt.

Um den Übertritt von Cholesterol aus dem Gallenstein in die Gallenflüssigkeit während der Steinauflösung zu erfassen, entnahmen wir von 22 Gallen, die mehrere Tage einen Stein umspült hatten, Proben und bestimmten in diesen nach der in Abschnitt 2.6. beschriebenen Methode die Cholesterolkonzentration.

Anschließend verglichen wir die Zunahme der Cholesterolmenge in der gesamten pro Versuch eingesetzten Gallenmenge von 30 ml mit der Gewichtsänderung der Gallensteine bis zum Tag der Probenentnahme (s. Tab. 13).

In Diagramm 12 ist der Zusammenhang zwischen Cholesterolzunahme in mg und der Gewichtsabnahme der Gallensteine in mg graphisch dargestellt. Es ergibt sich eine lineare Beziehung ($r = 0,96$) zwischen Gewichtsabnahme der Gallensteine und der Cholesterolzunahme in der Galle.

Die Gewichtsabnahme der Cholesterolgallensteine während der Gallensteinauflösung in vitro kann somit dadurch erklärt werden, daß neben anderen Gallenbestandteilen wie Phospholipid, Bilirubin und Calcium hauptsächlich die Lösung des Cholesterols aus dem Stein dessen Gewichtsreduktion verursachte.

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen Gewichtsabnahme (ΔG) der Gallensteine und der Cholesterolzunahme (ΔC) in der Galle.

Lfd. Nr.	ΔG (mg)	ΔC (mg)	Lfd. Nr.	ΔG (mg)	ΔC (mg)
1	52	35,6	12	17	13,2
2	87	75,1	13	72	66,3
3	27	28,0	14	110	76,5
4	45	28,3	15	46	40,0
5	29	20,7	16	9	18,3
6	44	36,4	17	30	26,8
7	20	17,6	18	48	40,2
8	38	32,9	19	31	25,0
9	14	12,7	20	17	24,3
10	31	22,9	21	27	29,8
11	9	9,7	22	17	14,7

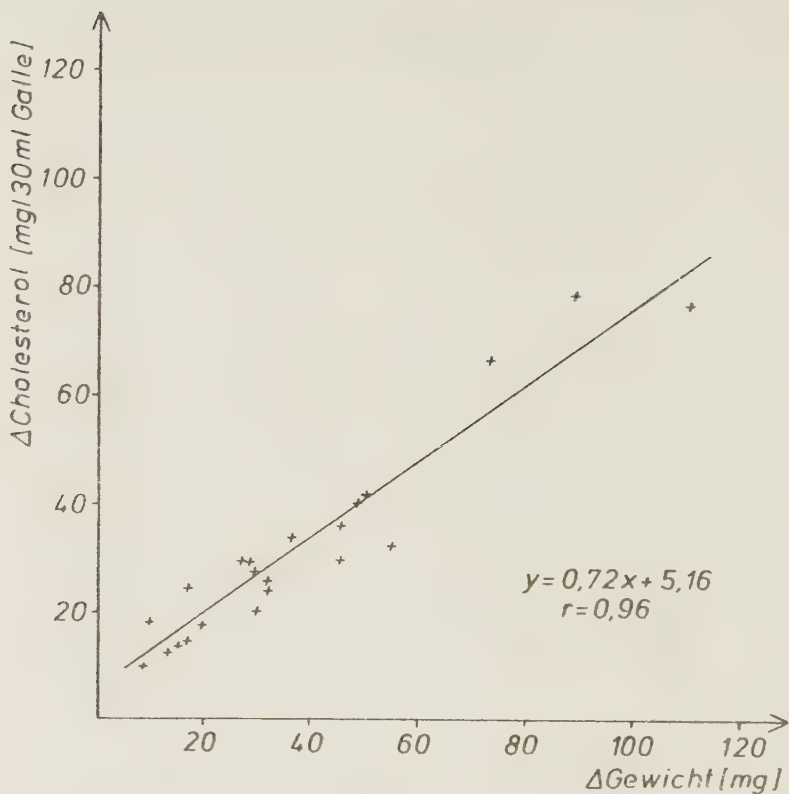


Diagramm 12: Die Gewichtsabnahme der Gallensteine bei Auflösung in vitro, ist hauptsächlich durch das Lösen des Cholesterols bedingt, welches in entsprechender Konzentration in der Galle nachgewiesen werden konnte.

B.3.2. Calcium

Da wir in dieser Studie die Beziehung zwischen Calciumgehalt der Gallensteine und deren Auflösungs-
geschwindigkeit beobachteten, wurde von den Gallen-
flüssigkeiten, in denen sich 10 Tage lang je ein
Gallenstein befand, Proben entnommen und mit der
Atomabsorptionsspektrometrie auf ihren Calcium-
gehalt hin analysiert. Es wurde die Zunahme der
Calciumkonzentration in der calciumhaltigen Ringer-
Lösung bestimmt.

Dabei konnten wir feststellen, daß sich die Calcium-
konzentration in der Galle bei einzelnen Proben um
bis zu maximal 4 mval/l erhöhte. Dies entspricht
einer Calciummenge von maximal 2,4 mg, die aus cal-
ciumhaltigen Gallensteinen herausgelöst wurde.

Tabelle 14: Änderung der Calciumkonzentration (ΔCa)
in der Galle bei Auflösung von Gallen-
steinen mit unterschiedlichem Calcium-
gehalt (Ca).

Lfd. Nr.	Stein- Ca (mg%)	Galle ΔCa (mval/l)	Lfd. Nr.	Stein- Ca (mg%)	Galle ΔCa (mval/l)
1	0,0	0,0	11	7,6	0,0
2	0,0	0,0	12	8,5	+1,0
3	0,0	0,0	13	16,9	+3,8
4	0,0	0,0	14	13,6	+3,4
5	0,0	0,0	15	28,5	0,0
6	1,7	-1,1	16	13,6	+3,5
7	1,6	0,0	17	13,6	0,0
8	1,6	0,0	18	13,6	0,0
9	0,5	-1,0	19	13,6	+4,0
10	7,6	+3,0	20	13,6	+3,1

3.4. Durchmesser der Gallensteine und Auflösungs- geschwindigkeit in vitro

Bei der medikamentösen Auflösung von Cholesterolgallensteinen mit CDC in vivo, geht man derzeit davon aus, daß eine Therapie nur dann sinnvoll ist, wenn neben anderen Kriterien (s. Abschnitt 1.3.2.2.) der Durchmesser nicht spontanschattengebender Steine im Cholangiogramm unter 20 mm liegt (27). Nach Ergebnissen von Thistle et al. (50) ist es nur zweckmäßig, Gallensteine mit einem Durchmesser unter 15 mm zu behandeln.

Bei Betrachtung der in Diagramm 5 und 7 dargestellten Zusammenhänge zwischen Oberfläche bzw. Gewicht der Gallensteine und deren Gewichtsabnahme wurde folgendes deutlich:

Steine, deren Oberfläche 175 mm^2 überschritt (s. Diagramm 5), bzw. Steine, deren Gewicht zu Versuchsbeginn größer als 150 mg war (s. Diagramm 7), zeigten insgesamt eine geringere relative Gewichtsabnahme, als Steine mit kleinerer Oberfläche und geringerem Gewicht.

Trägt man in einem Diagramm das Steingewicht gegen die jeweils zugehörige Oberfläche auf, so erkennt man, daß jedem möglichen Gewicht eine bestimmte Oberfläche zugeordnet werden kann (Diagramm 13, Tab. 7).

Es besteht ein exponentieller Zusammenhang zwischen Gewicht und Oberfläche.

Ferner können wir aus Diagramm 13 entnehmen, daß Steinen mit einer Oberfläche von ca. 175 mm^2 ein Gewicht von ca. 150 mg zugeordnet werden kann.

Für Steine mit größerer Oberfläche und mit höherem Gewicht konnten wir nach der oben beschriebenen Beobachtung eine geringere Auflösungsgeschwindig-

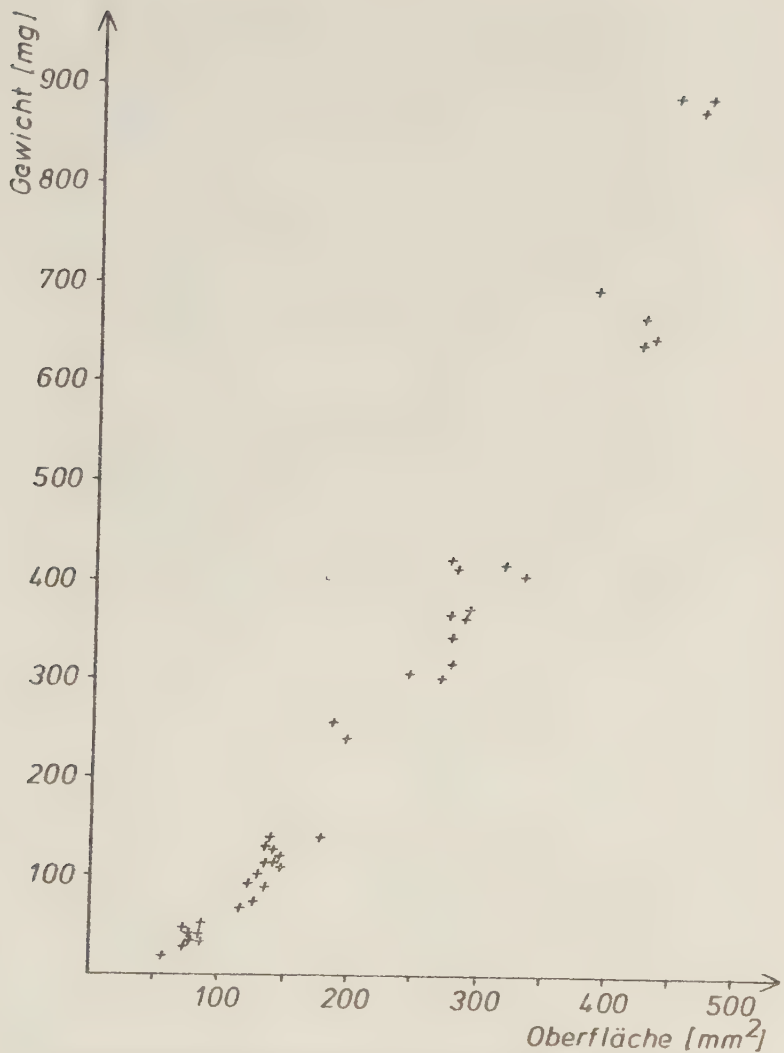


Diagramm 43: Beziehung zwischen Gewicht und Oberfläche der 41 von uns untersuchten Gallensteine aus Tabelle 7. Bei Cholesterolsteinen läßt sich jedem Steingewicht eine bestimmte Oberfläche zuordnen.

keit in vitro annehmen.

Wir bestimmten daraufhin bei 42 Gallensteinen verschiedener Patienten das Gewicht und mit einer Schiebelehre den maximalen Steindurchmesser (s. Tab. 15).

Diagramm 14 gibt für einen Gewichtsbereich von 100 bis 600 mg den linearen Zusammenhang zwischen Steingewicht und maximalem Steindurchmesser wieder ($r = 0,90$). Steine mit einem Gewicht von ca. 150 mg besitzen demnach einen maximalen Durchmesser von ca. 8 mm.

Aus unseren Beobachtungen leiten wir daher ab, daß bei der Gallensteinauflösung in vitro Steine mit einem Gewicht von mehr als 150 mg, einer Oberfläche von mehr als 175 mm^2 und damit einem maximalen Durchmesser von ca. 8 mm eine verlangsante Auflösung in einer künstlichen Galle zeigten.

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen Gewicht (G) und Durchmesser (D) von Gallensteinen verschiedener Patienten.

Lfd. Nr.	G (mg)	D (mm)	Lfd. Nr.	G (mg)	D (mm)
1	234	9,7	22	355	9,4
2	467	11,7	23	383	10,1
3	263	10,3	24	192	8,0
4	276	10,6	25	464	11,6
5	181	8,3	26	553	11,3
6	305	10,4	27	523	12,3
7	188	9,2	28	342	10,0
8	203	9,5	29	198	9,1
9	193	7,2	30	215	8,9
10	185	9,9	31	251	10,5
11	645	14,7	32	159	8,1
12	385	11,1	33	136	7,3
13	320	10,6	34	145	7,8
14	250	9,1	35	62	6,5
15	210	8,7	36	577	13,8
16	160	8,2	37	55	5,3
17	382	11,0	38	28	4,8
18	273	10,6	39	58	5,9
19	426	9,8	40	90	8,2
20	534	11,1	41	77	7,7
21	282	8,8	42	180	8,7

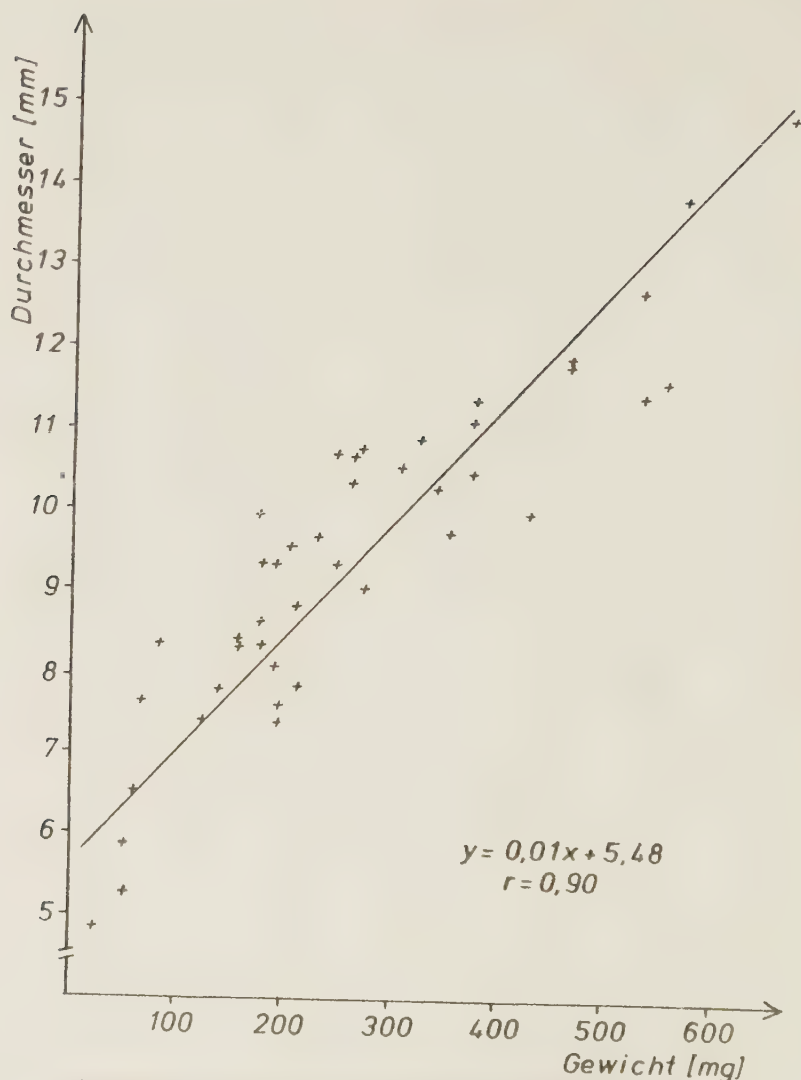


Diagramm 14: Bei Gallensteinen verschiedener Patienten besteht in einem Gewichtsbereich zwischen 100 - 600 mg ein linearer Zusammenhang von Steingewicht und maximalem Steindurchmesser.

4. DISKUSSION

Seit den ersten Veröffentlichungen über die erfolgreiche Anwendung von Chenodesoxycholsäure (CDC) zur Auflösung von Cholesterolgallensteinen hat die konservative Behandlung der Cholelithiasis immer mehr an Bedeutung gewonnen. Es wird dabei versucht, durch die Gabe von CDC das relative molare Verhältnis zwischen Gallensäuren, Phospholipid und Cholesterol zugunsten der Gallensäuren zu verschieben. Durch diese Einwirkung auf die Gallenzusammensetzung wird angestrebt, die Voraussetzungen zur Lösung kristallisierten Cholesterols zu schaffen, und damit eine Verkleinerung bzw. Auflösung von Cholesterolgallensteinen zu ermöglichen.

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen in-vivo-Studien die Wirksamkeit der CDC-Substitution klinisch nachgewiesen und durch eine verbesserte Indikationsstellung die Erfolgsquote der medikamentösen Therapie von Cholesterolgallensteinen erhöht.

Bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts zeigten Harley et al. (19), daß Gallensteine, die in die Gallenblase von lebenden Hunden implantiert worden waren, allmählich verschwanden. Ebenfalls wurde schon vor 30 Jahren bei Hunden und Ochsen, denen menschliche Gallensteine in die Gallenblase eingepflanzt worden waren, eine Steinauflösung in vivo beobachtet (60).

Neben diesen tierexperimentellen Studien wurden auch mehrere Versuche unternommen, Faktoren, welche die Gallensteinauflösung entscheidend beeinflussen in vitro zu erforschen.

Lutton und Large (29) berichteten 1957 von in-

vitro-Untersuchungen, die sie an operativ entnommenen Cholesterolgallensteinen vom Menschen durchgeführt hatten. Dabei benutzten sie eine Versuchsanordnung, die im Prinzip der von uns entwickelten (s. Abb. 6) entsprach.

Sie bestimmten den Gewichtsverlust der Gallensteine, die von Gallenblasen- und Lebergalle vom Menschen oder vom Hund umspült worden waren.

Hierbei konnte erstmals in vitro nachgewiesen werden, daß nicht wie früher angenommen die Gallenblase, sondern die Galle selbst für die Steinauflösung verantwortlich ist. Gleichzeitig beobachteten sie, daß die Cholesterolkonzentration der Galle einen wichtigen Einfluß auf die Steinauflösung besitzt und wiesen in diesem Zusammenhang auf die Bedeutung der Gallensäuren und des Lecithins hin.

Den Einfluß der Gallenzusammensetzung auf die Steinauflösung untersuchte Small (38) 1970 folgendermaßen in vitro:

Um zu sehen, ob Gallensäuren allein bzw. ein Gemisch aus Gallensäuren und Lecithin im Verhältnis 2 : 1 Gallensteine auflösen können, wurden operativ entnommene Cholesterolsteine in einem sterilen System mit in 0,15 N-NaCl-Lösung gelösten Gallensäuren bzw. Lecithin-Gallensäurengemisch über mehrere Monate bei 37°C inkubiert. Um gleiche Oberflächenverhältnisse der Gallensteine annehmen zu können, wurden von Small nur Steine mit Kugelform und einem Gewicht von 65,5 - 66 mg untersucht.

Nach seinen Beobachtungen verloren die Gallensteine in beiden Gruppen zunächst stark an Gewicht; nach 20 Tagen zeigten jedoch Steine, die nur von Gallensäuren umspült waren keine Gewichts -

abnahme mehr. Bei Steinen im Lezithin-Gallensäurengemisch konnte demgegenüber noch nach 80 Tagen eine Gewichtsreduktion beobachtet werden, wobei diese Steine im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht mehr an Gewicht verloren hatten, als die Steine im reinen Gallensäurengemisch.

In der hier vorliegenden Arbeit, konnten wir durch die in Abschnitt 2.5.1. beschriebene Methode der Oberflächenbestimmung auch bei unregelmäßig geformten Steinen die Oberfläche ermitteln und für unsere Untersuchungen verwenden.

Bei allen bisherigen in-vitro-Studien, die sich mit der Auflösung von Cholesterolgallensteinen befaßten, stand die Änderung der Gallenzusammensetzung und ihr Einfluß auf die Steinauflösung im Vordergrund.

In dieser Studie, gingen wir aber von der Frage aus, welchen Einfluß die Gallensteine selbst auf ihr Lösungsverhalten haben.

Dabei wurde erstmals in vitro untersucht, wie stark die Auflösungsgeschwindigkeit der Gallensteine durch ihren Calciumgehalt beeinflußt wird.

Ebenfalls wurde der Zusammenhang physikalischer Größen wie Oberfläche, Gewicht und Durchmesser der Gallensteine mit dem Lösungsverhalten dargestellt. In weiteren Experimenten ist die Einwirkung der Strömungsgeschwindigkeit der Galle auf die Auflösungsgeschwindigkeit untersucht worden.

Zur Bestimmung des Calciumgehaltes in Gallensteinen, entwickelten wir mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ein Verfahren, das eine bedeutende Verbesserung in der Mikroanalyse von Gallensteinen darstellt. Ein Vergleich der Calciumbestimmung mittels AAS und der flammenphoto-

metrischen Bestimmungsmethode (33) ergab, daß letztere Methode nur ca. 80 % der vorgegebenen Calciummenge erfaßte, während mit der AAS über 95 % bestimmt werden konnten.

Durch die Veraschung organischer Substanzen mit konzentrierter Schwefelsäure vor der flammenphotometrischen Bestimmung wird ein Teil des im Stein vorhandenen Calciums in wasserunlösliches Calciumsulfat überführt und damit der flammenphotometrischen Bestimmung entzogen. Angaben über den Calciumgehalt von Gallensteinen, die nach Veraschung mit Schwefelsäure gewonnen wurden, sind aus diesem Grunde mit Vorsicht zu bewerten.

Unsere in-vitro-Untersuchungen zeigten, daß Gallensteine mit einem Calciumgehalt in der Schale von 13,6 mg% und mehr sich langsamer auflösten, als Steine mit niedrigerem Gesamtcalcium (7,6 und 8,5 mg%) oder solchen, die calciumfrei waren. Gallensteine mit einer Calciumkonzentration von 13,6 mg% in der Schale gaben röntgenologisch einen Spontanschatten und verminderten ihr Gewicht in 8 Tagen um weniger als 7 % des Ausgangsgewichtes, während Gallensteine ohne Calcium durchschnittlich über 25 % ihres Ausgangsgewichtes im selben Zeitraum verloren.

Bisher berücksichtigte man bei der Indikationsstellung zur CDC-Therapie, ob die Gallensteine röntgenologisch spontanschattengebend waren oder nicht. Klinische Erfahrungen zeigten, daß spontanschattengebende Steine, d.h. Steine mit hohem Calciumgehalt sich nicht unter der CDC-Therapie auflösten:

"Die Einteilung der Gallensteine auf Grund ihrer Röntgenbilder in strahlendurchlässige (radio-lucent) und in strahlenundurchlässige (radio-paque) Konkreme ist als Beschreibung und zur

Abgrenzung aller Steine mit anorganischem Kalziumgehalt brauchbar. Kalziumpalmitat gibt nur in seltenen Fällen eine Strahlenabsorption, welche mit der der Kalziumkarbonate oder Kalziumphosphate vergleichbar ist. Strahlendurchlässige Konkremente können Kalziumpalmitat enthalten, über dessen Lösungsfähigkeit durch CDC nichts bekannt ist..." (62)

Chemische Analysen von Weis et al. (59) an 50 Gallensteinen zeigten, daß auch strahlendurchlässige Gallensteine Calcium enthalten können. Dieses muß aber nicht nur an Palmitat gebunden sein, sondern kann auch als Calciumkarbonat vorliegen.

In den von uns durchgeführten in-vitro-Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß auch der Calciumgehalt strahlendurchlässiger Cholesterolsteine, die nach Weis et al. (59) bis zu 13 % Calcium enthalten können, die Auflösungsgeschwindigkeit beeinträchtigt.

Nach diesen Ergebnissen ist also damit zu rechnen, daß auch bei Patienten mit strahlendurchlässigen Gallensteinen, wie es für eine CDC-Therapie gefordert wird, die Steinauflösung durch geringe Mengen von Calcium verzögert werden kann. Dies würde die Vermutung von Weis et al. (59) bestätigen, daß wahrscheinlich eine Hauptursache für das Versagen der medikamentösen Gallensteinauflösung darin besteht, daß röntgenologisch negative Gallensteine bis zu 13 % Calcium enthalten können.

Bell et al. (5) berichteten von in-vitro-Untersuchungen, die zeigten, daß das Vorhandensein einer strahlendichten äußeren Schale aus calciumhaltigem Material die Gallensteinauflösung in einer Galle vom Hund verhinderte.

Dem steht unsere Beobachtung entgegen, daß 8 Steine mit einer strahlenundurchlässigen Schale (Stein-Nr. 31 bis 38 in Tab. 7 und 9), in der eine Calciumkonzentration von 13,6 mg% nachgewiesen wurde und 1 Stein (Stein-Nr. 39 in Tab. 7 und 9), der vollständig spontanschattengebend war (16,9 mg% Ca), nach achttägigem Umspülen mit einer künstlichen Galle, eine geringe Gewichtsreduktion zeigten (s. Tab. 7 und 9).

Das negative Ergebnis von Bell et al. beruht möglicherweise darauf, daß die Hundegalle schon Cholesterol enthielt, während die von uns verwendete künstliche Galle zu Versuchsbeginn cholesterolfrei war.

Zum Einfluß von Oberfläche und Gewicht der Gallensteine auf ihre Lösungsgeschwindigkeit konnten wir folgendes feststellen:

Bei Betrachtung der relativen Gewichtsabnahme lösten sich die Steine um so langsamer auf, je größer ihre Oberfläche und ihr Gewicht zu Versuchsbeginn war.

Die Auflösung von Gallensteinen in vitro wird gemeinsam beeinflußt vom Calciumgehalt der Steine, deren Oberfläche und Gewicht. Dabei kommt jedoch dem Calciumgehalt vor der Oberfläche und dem Gewicht die größte Bedeutung zu.

Innerhalb einer Oberflächenänderung von 10 bis 50 mm² fanden wir eine lineare Beziehung zur Gewichtsänderung der Gallensteine.

Zwischen der Gewichtsabnahme der Gallensteine und der Cholesterolzunahme in der künstlichen Galle besteht ebenfalls ein linearer Zusammenhang. Die Gewichtsabnahme scheint somit hauptsächlich durch das Herauslösen von Cholesterol aus dem Gallenstein bedingt zu sein.

Bell et al. (5) untersuchten ebenfalls Faktoren, die die Auflösung von menschlichen Gallensteinen beeinflussen. Die Steine wurden sowohl chemisch als auch mittels Röntgenbeugung analysiert und dann in vitro in Galle vom Rhesusaffen inkubiert. Unter anderem ergaben diese Studien, daß die Steinauflösung um so schneller vonstattengeht, je größer das Verhältnis Oberfläche zu Gewicht der Steine ist.

Wir bestimmten ebenfalls den Quotienten aus Oberfläche und Gewicht von 16 Steinen verschiedener Patienten (Stein-Nr. 1 bis 16 in Tab. 7 und 9). Gemeinsames Merkmal dieser Steine war, daß sie kein Calcium enthielten.

In Tabelle 16 und Diagramm 15 ist die Beziehung zwischen dem Verhältnis Oberfläche/Gewicht und der relativen Gewichtsabnahme dargestellt.

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen dem Quotienten Oberfläche/Gewicht (O/G) und der relativen Gewichtsabnahme (ΔG).

Stein-Nr.	(O/G)	(ΔG) (%/8 Tage)	Stein-Nr.	(O/G)	(ΔG) (%/8 Tage)
1	0,831	17,6	9	2,515	78,8
2	1,266	25,9	10	1,790	23,2
3	1,303	39,4	11	0,783	7,6
4	1,541	34,1	12	0,677	4,4
5	1,933	53,4	13	0,672	4,9
6	2,772	63,6	14	0,774	10,0
7	0,609	16,3	15	0,776	8,6
8	0,873	18,4	16	0,835	8,5

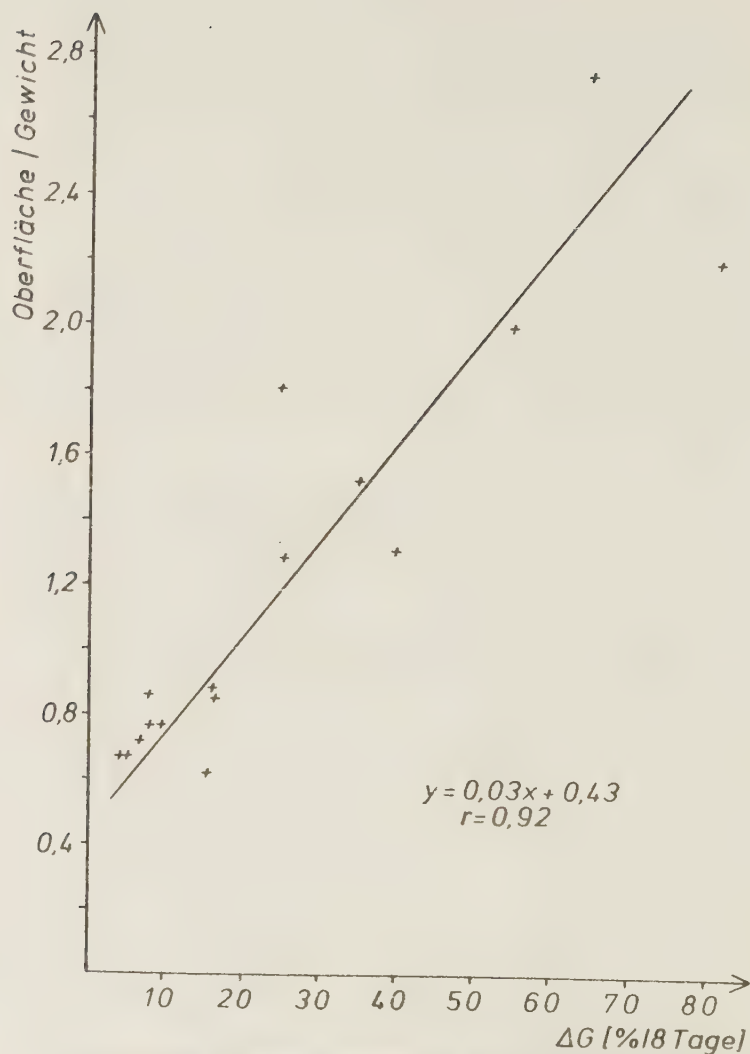


Diagramm 15: Mit steigendem Quotienten aus Oberfläche und Gewicht von calciumfreien Gallensteinen verschiedener Patienten nimmt die relative Gewichtsabnahme ΔG linear zu.

Auch bei uns zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Verhältnis Oberfläche/Gewicht der Gallensteine und deren relativen Gewichtsabnahme ($r = 0,92$), so daß bei Gallensteinen mit Zunahme des Quotienten Oberfläche/Gewicht die Auflösungsgeschwindigkeit steigt.

Diagramm 15 verdeutlicht nochmals den engen Zusammenhang zwischen Oberfläche und Gewicht der Gallensteine in bezug auf ihre Auflösung.

Beim Vergleich der Auflösungsgeschwindigkeiten von Gallensteinen gleicher Zusammensetzung in einer zirkulierenden Galle mit der Auflösungsgeschwindigkeit von Steinen in einer nicht bewegten Galle stellten wir fest, daß sich die Steine in der nicht bewegten Galle langsamer auflösten.

Zur Frage, welchen Einfluß die Strömungsgeschwindigkeit der Galle auf die Gallensteinauflösung besitzt, entwickelten Tao et al. (47) physikalische Modelle der Steinauflösung, deren Richtigkeit sich in experimentellen Untersuchungen bestätigte. Danach wird der Lösungsvorgang des Cholesterols aus dem Gallenstein in die umgebende Galle von folgenden physikalischen Vorgängen bestimmt:

- 1.) Diffusion der cholesterolfreien Mizellen zur Gallensteinoberfläche
- 2.) Herauslösen des Cholesterols aus der Steinoberfläche in die adsorbierten Mizellen
- 3.) Diffusion der beladenen Mizellen von der Steinoberfläche in die Galle.

Jedem dieser drei Stufen im Lösungsvorgang kommt eine unterschiedliche Bedeutung für die Steinauflösung in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit der Galle zu.

Bei größerer Strömungsgeschwindigkeit ist die Auflösung unabhängig vom Gallefluß und nur durch die Geschwindigkeit der Cholesterollösung aus dem Stein in die Mizelle bestimmt. In einer ruhenden Galle dagegen wird die Auflösungsgeschwindigkeit ausschließlich durch die Diffusion der Mizellen zur Steinoberfläche hin und von ihr weg bestimmt.

Die günstigsten Lösungsbedingungen bestehen bei einem hohen Gallefluß, bei dem nur das Herauslösen des Cholesterols aus dem Stein die Auflösungsrate bestimmt.

In unseren Untersuchungen konnten wir die Auswirkung eines nicht bestehenden Galleflusses auf die Auflösungsgeschwindigkeit ebenfalls feststellen. Die Steine lösten sich in der nicht bewegten Galle sehr viel langsamer auf, als in der zirkulierenden Galle. Dies steht in enger Beziehung zu den Ergebnissen von Würbach und Weis (63), die nachweisen konnten, daß sich die Gallenblase bei Steinträgern auf eine gleich große Dosis Cholecystokinin schlechter entleert als bei Normalpersonen ohne Cholelithiasis.

Untersuchungen von Dam et al. (11) und Holzbach et al. (25) zeigten, daß nicht nur bei Steinträgern, sondern auch bei nicht an Gallensteinen erkrankten Personen vorübergehend eine mit Cholesterol übersättigte, lithogene Galle vorgefunden werden kann. Ist in der Gallenblase eine solche lithogene Galle vorhanden, so könnte bei eingeschränkter Motilität der Gallenblase (z.B. nach Cholecystitis) durch den verminderten Gallefluß Cholesterol leichter präzipitieren und die Cholesterolsteinbildung veranlassen. Gleichzeitig würden unter den Bedingungen eines verlangsamten Galleflusses in

der Gallenblase die Aussichten einer erfolgreichen Steinauflösung mit CDC verschlechtert.

Studien von Iser et al. (27) zeigten, daß der Durchmesser von Gallensteinen im Röntgenbild als Kriterium für den abzusehenden Erfolg einer CDC-Therapie dienen kann. Danach ist eine Litholyse mit CDC nur dann sinnvoll, wenn der Durchmesser der nicht spontanschattengebenden Cholesterolsteine im Cholangiogramm weniger als 20 mm beträgt. Nach Ergebnissen von Thistle et al. (50) sollten die Steine sogar weniger als 15 mm Durchmesser besitzen, um eine erfolversprechende CDC-Therapie einzuleiten.

Da sich bei der röntgenologischen Darstellung der Gallenblase die Röntgenstrahlen divergent von einer annähernd punktförmigen Strahlenquelle ausbreiten, unterliegen sie den Gesetzen der Zentralprojektion. Liegt das abzubildende Objekt, d.h. der Gallenstein, nicht unmittelbar dem Film an, so wird es vergrößert dargestellt.

Dies muß auch bei der Beurteilung des wirklichen Gallensteindurchmessers aus dem Röntgenbild beachtet werden. Der im Röntgenbild dargestellte Stein erscheint somit projektionsbedingt etwas größer, als dies in Wirklichkeit der Fall ist. Wir bestimmten den Durchmesser der von uns für diesen Teil der Arbeit verwendeten Gallensteine nicht aus dem Röntgenbild, sondern mittels einer Schiebelehre. Dabei ergab sich für Steine mit einem Gewicht zwischen 75 und 550 mg eine lineare Beziehung zwischen dem Gewicht und dem Durchmesser der Steine.

Um Aussagen über das Volumen von Gallensteinen in der Gallenblase machen zu können, wurde bisher

der Durchmesser des Steines im Röntgenbild herangezogen. Theoretische Überlegungen von Weis (61) zeigen jedoch, daß die Fläche der von Gallensteinen im Röntgenbild hervorgerufenen Verschattung (bzw. Aufhellung nicht spontanschattengebender Steine im Cholangiogramm) einen engeren Zusammenhang mit dem Steinvolumen besitzt, als der aus dem Röntgenbild ermittelte Steindurchmesser.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen, daß es von großer Bedeutung ist, Gallensteine möglichst frühzeitig zu diagnostizieren. Denn gerade kleine Cholesterolsteine mit niedrigem Calciumgehalt bieten eine große Chance für eine rasche erfolgreiche medikamentöse Gallensteinauflösung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Während in bisher veröffentlichten in-vitro-Studien über die Auflösung von Cholesterolgallensteinen der Einfluß der Gallenzusammensetzung im Vordergrund stand, wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen physikalisch-chemischen Merkmalen der Gallensteine selbst und ihrem Lösungsverhalten dargestellt.

Zur Bestimmung des Calciumgehaltes in Gallensteinen entwickelten wir mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie ein Verfahren, das gegenüber der bisher gebräuchlichen Methode eine bedeutende Verbesserung in der Mikroanalyse von Gallensteinen darstellt.

An Hand von insgesamt 41 Gallensteinen bekannter chemischer Zusammensetzung wurde in vitro der Einfluß von Calciumgehalt, Oberfläche, Gewicht und Durchmesser der Steine auf ihre Auflösungsgeschwindigkeit in einer künstlichen Galle untersucht.

Wir konnten zeigen, daß die Auflösung von röntgenologisch spontan- als auch nicht spontanschattengebenden Gallensteinen in vitro von ihrem Calciumgehalt, ihrer Oberfläche, ihrem Gewicht und ihrem Durchmesser beeinflusst wird. Hierbei kommt dem Calciumgehalt vor der Oberfläche und dem Gewicht die größte Bedeutung zu. Je höher der Calciumgehalt und je größer die Oberfläche und das Gewicht der Steine, um so langsamer die Auflösung.

Ebenfalls konnte in dieser Arbeit in vitro dargestellt werden, daß eine zirkulierende Galle, im Gegensatz zu einer nicht bewegten Galle, die Auflösung von Gallensteinen beschleunigt.

Die Gewichtsabnahme der Steine war in erster Linie

auf das Herauslösen des Cholesterols aus den Gallensteinen zurückzuführen, das in entsprechender Konzentration in der Galle wiedergefunden werden konnte. Aus 14 calciumhaltigen Gallensteinen lösten sich maximal 2,4 mg Calcium in 10 Tagen heraus.

Die Ergebnisse dieser in-vitro-Studien beweisen die Forderung, daß der medikamentösen Gallensteintherapie nur dann eine hohe Erfolgsrate beschieden sein wird, wenn Patienten mit kleinen calciumfreien Gallensteinen und funktionstüchtiger Gallenblase möglichst frühzeitig medikamentös behandelt werden.

6. L I T E R A T U R

- 1 Admirand, W.H.; Small, D.M.: The physico-chemical basis of cholesterol gallstone formation in man
J Clin Invest 47, 1043-1052 (1968)
- 2 Back, P.: Zur Epidemiologie des Gallensteinleidens
Leber Magen Darm 4, 13-16 (1974)
- 3 Bainton, D.; Rhodes, J.: Letter: Cheno-deoxycholic acid and the liver
Lancet 1, 562 (1974)
- 4 Begemann, F.: Arbeitssitzung der 30. Tagung der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten. Medikamentöse Gallensteinauflösung
Z Gastroenterol 14, 212-220 (1976)
- 5 Bell, G.D.; Sutor, D.J. et al.: Factors influencing human gallstone dissolution in monkey, dog and human bile
Gut 13, 836 (1972)
- 6 Bell, G.D.; Whitney, B. et al.: Gallstone dissolution in man using cheno-deoxycholic acid
Lancet 2, 1213-1216 (1973)
- 6 Biss, K.; Ho, K.J. et al.: Some unique biologic characteristics of Masai in East Africa
N Engl J Med 284, 694-699 (1971)

- 8 Borgström, B.: Partition of lipids between emulsified oil and micellar phases of glyceride-bile salt dispersion
J Lipid Res 8, 598-608 (1967)
- 9 Bouchier, I.A.: Gallstone formation
Lancet 1, 711-715 (1971)
- 10 Carey, M.C.; Small, D.M.: Micelle formation by bile salts
Arch Intern Med 130, 506-527 (1972)
- 11 Dam, H.; Hegardt, F.G.: The solubility of cholesterol in aqueous solutions of bile salts and lecithin
Z Ernährungswiss 10, 223-233 (1971)
- 12 Danzinger, R.G.; Hofman, A.F. et al.: Dissolution of cholesterol by CDCA
N Engl J Med 286, 1-7 (1972)
- 13 Erb, W.: Die Entstehung von Gallensteinen
Med Klin 68, 131-135 (1973)
- 14 Erb, W.: Pathophysiologische Grundlagen der Gallensteinauflösung
Leber Magen Darm 4, 72-74 (1974)
- 15 Farrell, K.E.; Smith, D.C. et al.: Gall-stone dissolution in vitro
Br J Surg 60, 900 (1973)
- 16 Fernandez, F.J.; Kahn, H.J.: Clinical methods for atomic absorption spectroscopy
Clin Chem Newsletter 3, 24-28 (1971)
- 17 Goldstein, L.J.; Schoenfield, J.J.: Gall-stones: pathogenesis and medical treatment
Adv Int Med 20, 89-119 (1975)

- 18 Gottfries, A.; Nilsson, S. et al.: Phospho-
lipids in human hepatic bile, gall-
bladder bile and plasma in cases
with acute cholecystitis
Scand J Clin Invest 21, 168-176 (1968)
- 19 Harley, V.; Barratt, W.: An experimental en-
quiry into the formation of gallstones
J Physiol 29, 341-351 (1903)
- 20 Heaton, K.W.; Read, A.E.: Gallstones in Patients
with disorders of the terminal ileum
and disturbed bile salt metabolism
Br Med J 3, 494-496 (1969)
- 21 Heaton, K.W.: The epidemiology of gallstones
and suggested aetiology
Clin Gastroenterol 2, 67-83 (1973)
- 22 Higuchi, W.I.; Sjuib, F. et al.: Dissolution
kinetics of gallstones: physical
model approach
J Pharm Sci 62, 943-945 (1973)
- 23 Higuchi, W.I.; Prakongpan, S. et al.: Mecha-
nisms of dissolution of human chole-
sterol gallstones
J Pharm Sci 62, 945-948 (1973)
- 24 Hisatsugu, T.; Igimi, H. et al.: Dissolution
of human gallstone
Jpn J Surg 2, 62-72 (1972)
- 25 Holzbach, R.T.; Marsh, M. et al.: Cholesterol
solubility in bile
J Clin Invest 52, 1467-1479 (1973)
- 26 Ingelfinger, F.J.: Digestive disease as a
national problem
Gastroenterology 55, 102-104 (1968)

- 27 Iser, I.H.; Dowling, R.H. et al.: CDCA-treatment of gallstones
N Engl J Med 293, 378-385 (1975)
- 28 Lahana, D.A.; Bonorris, G.G. et al.: Gallstone dissolution in vitro by bile acids, heparin and quaternary amines
Surg Gynecol Obstet 138, 683-685 (1974)
- 29 Lutton, R.G.; Large, A.M.: Gallstones: solubility studies
Surgery 42, 488-492 (1957)
- 30 Maki, T.: Pathogenesis of calcium bilirubinate gallstone
Ann Surg 164, 90-100 (1966)
- 31 Mosbach, E.H.: Regulation of bile acid synthesis
Verh Dtsch Ges Inn Med 80, 393-399 (1974)
- 32 Nufson, D.; Triyanond, K. et al.: Cholelithiasis chemotherapy: an in vitro approach
J Pharm Sci 64, 362-364 (1975)
- 33 Nakayama, F.: Quantitative microanalysis of gallstones
J Lab Clin Med 72, 602-611 (1968)
- 34 Northfield, T.C.; Larusso, N.F. et al.: Mechanism of action of CDCA in gallstone dissolution
Gut 14, 826-827 (1973)
- 35 Foes, K.; Weis, H.J.: persönliche Mitteilung
- 36 Samplinger, R.E.; Bennett, M.B. et al.: Gallbladder disease in Pima indians
N Engl J Med 283, 1358-1384 (1970)

- 37 Scott, A.J.; Kahn, G.A.: Partial biliary obstruction with cholangitis producing a blind loop syndrom
Gut 9, 187-192 (1968)
- 38 Small, D.M.: The formation of gallstones
Adv Intern Med 16, 243-264 (1970)
- 39 Sperry, D.J.; Weble, M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination
J Biol Chem 187, 97-106 (1950)
- 40 Sutor, D.J.; Wooley, S.E.: X-ray diffraction studies of the composition of gallstones from English and Australien patients
Gut 10, 681-683 (1969)
- 41 Sutor, D.J.: Calcium palmitate and alpha-palmitic acid in gallstones
Gut 11, 618-619 (1970)
- 42 Sutor, D.J.; Wooley, S.E.: Astatistical survey of the composition of gallstones in eight countries
Gut 12, 55-64 (1971)
- 43 Sutor, D.J.; Woolley, S.E.: The nature and incidence of gallstones containing calcium
Gut 14, 215-220 (1973)
- 44 Sutor, D.J.; Wooley, S.E.: The sequential deposition of crystalline material in gallstones
Gut 15, 130-131 (1974)

- 45 Sutor, D.J.: Letter: Possible sources of errors in some physico-chemical studies of gallstone formation
Gastroenterology 66, 477-479 (1974)
- 46 Swell, L.; Gregory, D.H. et al.: Current concepts of the pathogenesis of cholesterol gallstones
Med Clin North Am 58, 1449-1471 (1974)
- 47 Tao, J.C.; Cussler, E.L. et al.: Accelerating gallstone dissolution
Proc Natl Acad Sci USA 71, 3917-3921 (1974)
- 48 Thistle, L.J.; Eckhardt, K.L. et al.: Prevalence of gallbladder disease among Chippewa Indians
Mayo Clin Proc 46, 603-608 (1971)
- 49 Thistle, L.J.; Hofman, A.F.: Efficacy and specificity of CDCA-therapy for dissolving gallstones
N Engl J Med 289, 655-659 (1973)
- 50 Thistle, J.L.; Hofman, A.F. et al.: Gallstone dissolution with CDCA 1969-76
Gastroenterology 70, 943 (1976)
- 51 Thistle, L.J.; Schoenfield, L.J.: Induced alterations in composition of bile of persons having cholelithiasis
Gastroenterology 61, 488-496 (1971)
- 52 Thistle, L.J.; Schoenfield, L.J.: Lithogenic bile among young Indian women
N Engl J Med 284, 177-181 (1971)

- 53 Trudeau, D.; Freier, E.: Determination of calcium in urine and serum by atomic absorption spectrophotometry (AAS)
Clin Chem 13, 101-114 (1967)
- 54 Vlahcevic, Z.R.; Bell, C.C. et al.: Significance of the liver in the production of lithogenic bile in man
Gastroenterology 59, 62-69 (1970)
- 55 Vlahcevic, Z.R.; Bell, C.C. et al.: Diminished bile acid pool size in patients with gallstones
Gastroenterology 59, 165-173 (1970)
- 56 Vlahcevic, Z.R.; Buhac, I. et al.: Abnormal metabolism of secondary bile acids in patients with cirrhosis
Gut 11, 420-422 (1970)
- 57 Way, L.W.: In vitro dissolution of cholesterol gallstones
Surg Forum 24, 412-414 (1973)
- 58 Weis, H.J.: Klinischer Überblick über die bisherigen Ergebnisse der Therapie mit Chenodesoxycholsäure und die Frage der Dosierung
In: Fortschritte und Tendenzen in der Gastroenterologie
Ed.: Ottenjann, Baden-Baden (1975)
254-258
- 59 Weis, H.J.; Grünert, A. et al.: Die chemische Zusammensetzung röntgenologisch nicht schattengebender Gallensteine
Verh Dtsch Ges Inn Med 81, 1313-1315 (1975)

- 60 Weis, H.J.: Role of bile acids in the
formation and dissolution of
gallstones
Verh Dtsch Ges Inn Med 80, 338-343
(1974)
- 61 Weis, H.J.: persönliche Mitteilung
- 62 Wosiewicz, U.; Wolpers, C.: Kalzium in Kalk-
gallen und Gallensteinen
Leber Magen Darm 5, 3-12 (1975)
- 63 Würbach, M.; Weis, H.J.: persönliche Mit-
teilung

Meinen Dank für das Interesse, das Herr
Prof. Dr. H.J. Weis meiner Arbeit entge-
gebracht hat, möchte ich an dieser Stel-
le zum Ausdruck bringen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. med.E. Scheidt
vom Institut für Medizinische Statistik und
Dokumentation,
sowie Frl. I. Grünbauer für ihre labortech-
nische Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 6.5.1954 wurde ich, Johannes Maria Schäfer in Mühlheim/Main als Sohn des Kaufmanns Georg W. Schäfer und dessen Frau Maria geb. Hofmann geboren.

Bis 1968 besuchte ich die Grund- und Realschule in Mühlheim/Main und wechselte dann an das Friedrich Ebert-Gymnasium in Mühlheim/Main über. Hier bestand ich im Juni 1972 im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Oberstufe das Abitur.

Im Oktober 1972 begann ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Folgende Examina wurden an dieser Hochschule erfolgreich abgelegt:

Ärztliche Vorprüfung: August 1974.

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: August 1975

Zweiter " " " " : August 1977

Dritter " " " " : Oktober 1978

Zum 1. Dezember 1978 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Am 17. Januar 1979 wurde ich in den Medizinischen Fachbereichen der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz zum Dr. med. promoviert.

